

19.017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR



CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA  
COMPOSICION POLIFENOLICA DE MADERA, CORTEZA Y HOJAS  
DE *EUCALYPTUS CAMALDULENSIS*, *E. GLOBULUS* Y *E. RUDIS*

TESIS DOCTORAL



ELVIRA M<sup>a</sup> CONDE ARIAS-CAMISON

Madrid 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA  
COMPOSICION POLIFENOLICA DE MADERA, CORTEZA Y HOJAS  
DE *EUCALYPTUS CAMALDULENSIS*, *E. GLOBULUS* Y *E. RUDIS*

TESIS DOCTORAL

que, para optar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS,

presenta

ELVIRA M<sup>a</sup> CONDE ARIAS-CAMISON

Licenciada en Ciencias Químicas

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología  
Agraria y Alimentaria

Madrid 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA  
COMPOSICION POLIFENOLICA DE MADERA, CORTEZA Y HOJAS  
DE *EUCALYPTUS CAMALDULENSIS*, *E. GLOBULUS* Y *E. RUDIS*

TESIS DOCTORAL

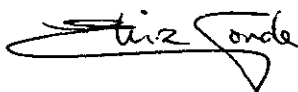
que, para optar al grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS,

presenta

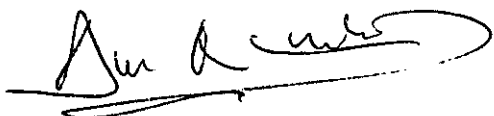
ELVIRA M<sup>a</sup> CONDE ARIAS-CAMISON

Licenciada en Ciencias Químicas

Autora

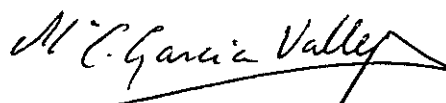


Tutora:  
ANA MARTINEZ DIAZ



Vº Bº Tutora

Directora:  
M<sup>a</sup> CONCEPCION GARCIA VALLEJO



Vº Bº Directora

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología  
Agraria y Alimentaria  
Madrid 1994

*A mis padres*



## Agradecimiento

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la directora de este trabajo, Dra. Dña. M<sup>a</sup> Concepción García Vallejo, Coordinadora del Area de Química Forestal del Departamento de Industrias Forestales del CIT-INIA (Centro de Investigación y Tecnología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria), por su orientación en la realización de esta Tesis, así como por su apoyo, colaboración y cariño.

Agradezco a Dña. Estrella Cadahía Fernández, del Dpto. de Industrias Forestales del CIT-INIA, toda la ayuda, paciencia y aliento que me ha prestado a lo largo del trabajo experimental y de la elaboración de la Memoria de esta Tesis Doctoral.

Quiero asimismo dar las gracias a D. Rafael Díez-Barra, del Dpto. de Sistemas Forestales del CIT-INIA, sin cuyos conocimientos informáticos y matemáticos no hubiera sido posible la realización de los análisis numéricos que completan esta Memoria.

Al INIA, mi agradecimiento por la concesión de una beca predoctoral que me ha permitido la realización de la Tesis; y a los Dres. D. Alberto Caperos Sierra y D. Juan Ignacio Fernández Golfín, Jefes del Dpto. de Industrias Forestales del CIT-INIA durante mi estancia en el Dpto., por haberme facilitado el desarrollo de este trabajo.

Debo expresar mi gratitud a la Dra. Dña. Ana Martínez Díaz, del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de CC. Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, por haber aceptado la tutoría de esta Tesis.

Mi gratitud a mis compañeros del Dpto. de Industrias Forestales del CIT-INIA, especialmente, a Dña. Alicia Moral, D. Ramón Pérez, D. Esteban Revilla, D. Antonio Sánchez, D. Juan

Carlos Villar, Dña. M<sup>a</sup> Jesús Callejo y Dña. M<sup>a</sup> Brígida Fernández de Simón, que han facilitado mi trabajo; así como, a D. Jesús de Miguel, del Dpto. de Sistemas Forestales del CIT-INIA, por su ayuda en la elaboración de los gráficos y diagramas climáticos.

Por último, quiero agradecer a mi familia su apoyo; especialmente, a mis padres, por su ayuda, fe y confianza demostradas en todo momento, y a mi hermano José Ignacio, de quien quiero hacer especial mención por su esfuerzo, paciencia y colaboración en la preparación de esta Memoria.

## **INDICE**

## INDICE

	<u>Pág.</u>
<b>I. OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCION.....</b>	<b>5</b>
<b>1. CLASIFICACION BOTANICA Y MORFOLOGIA</b>	
DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.....	6
1.1. CLASIFICACION BOTANICA.....	6
1.2. MORFOLOGIA.....	7
<b>2. COMPUESTOS FENOLICOS.....</b>	<b>18</b>
2.1. DISTRIBUCION DE LOS COMPUESTOS	
FENOLICOS EN LOS VEGETALES.....	18
2.2. ESTRUCTURA Y DESCRIPCION QUIMICA.....	19
2.2.1. Acidos y aldehídos benzoicos y alcoholes	
bencílicos C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> .....	20
2.2.2. Acidos cinámicos y compuestos asociados	21
2.2.3. Flavonoides.....	23
2.3. BIOSINTESIS.....	33
2.3.1. Rutas biosintéticas de compuestos	
fenólicos.....	33
2.3.2. Biosíntesis de flavonoides.....	38
2.4. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.....	45
2.5. FUNCIONES BIOLOGICAS.....	52
2.5.1. Defensa vegetal.....	52
2.5.2. Contribución al color en los vegetales	53
2.5.3. Reguladores fisiológicos.....	54
2.5.4. Filtros UV.....	55
2.6. APLICACIONES FARMACOLOGICAS.....	56
2.6.1. Actividad antiinflamatoria.....	56
2.6.2. Actividad antihepatotóxica.....	57
2.6.3. Efectos en el sistema vascular.....	58
2.6.4. Actividad antitumoral.....	58
2.6.5. Actividad antimicrobiana y antiviral...	59
2.6.6. Actividades diversas.....	60
2.7. APLICACIONES QUIMIOTAXONOMICAS.....	62
2.8. APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.....	64

2.8.1. Propiedades gustativas.....	64
2.8.2. Agentes antioxidantes.....	65
2.8.3. Colorantes naturales.....	68
3. COMPUESTOS FENOLICOS EN EL GENERO <i>EUCALYPTUS</i> .....	69
3.1. MADERA.....	69
3.2. CORTEZA.....	70
3.3. HOJAS.....	70
3.4. "KINO".....	72
 III. MUESTRAS.....	73
1. SELECCION DE MUESTRAS.....	74
2. CARACTERIZACION DE MUESTRAS.....	76
2.1. CARACTERIZACION DE HOJAS. ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES.....	76
2.2. CARACTERIZACION DE MADERAS. DETERMINACIONES QUIMICAS. NORMAS.....	77
 IV. EXTRACCION.....	85
1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	86
2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS.....	91
2.1. MOLIENDA Y TAMIZADO.....	91
2.2. DETERMINACION DE HUMEDAD.....	92
3. ENSAYOS PRELIMINARES DE EXTRACCION.....	93
3.1. EXTRACCION CON METANOL, EN CALIENTE, PRECEDIDA DE LIMPIEZA CON $\text{CHCl}_3$ .....	93
3.2. EXTRACCION, EN FRIO, CON METANOL.....	95
3.3. EXTRACCIONES SIMPLIFICADAS.....	97
3.4. ENSAYOS SISTEMATICOS DE RENDIMIENTOS DE EXTRACCION.....	98
3.5. METODO DEFINITIVO DE EXTRACCION.....	108
 V. ANALISIS DE COMPUESTOS FENOLICOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	110
1. INTRODUCCION.....	111
2. APLICACION AL ESTUDIO DE COMPUESTOS FENOLICOS. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	112
2.1. SOPORTES.....	112

2.2.1. Gel de sílice.....	112
2.2.2. Celulosa.....	113
2.2.3. Poliamida.....	114
2.3. REVELADORES.....	115
3. APLICACION DE CCF AL ANALISIS DE COMPUESTOS FENOLICOS DEL GENERO <i>EUCALYPTUS</i> . ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	118
4. METODOLOGIA.....	119
4.1. CCF DE FLAVONOIDES.....	119
4.1.1. Ensayos preliminares.....	119
4.2. CCF DE ACIDOS Y ALDEHIDOS FENOLICOS.....	136
4.3. METODO DEFINITIVO.....	137
 <b>VI. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.....</b>	 138
1. INTRODUCCION.....	139
2. APLICACION AL ANALISIS DE COMPUESTOS FENOLICOS. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	141
2.1. COLUMNAS.....	141
2.2. ELUYENTES.....	142
2.3. DETECCION.....	143
2.4. RELACION ENTRE ESTRUCTURA QUIMICA Y TIEMPO DE RETENCION.....	144
2.5. ANALISIS CUANTITATIVO.....	148
2.6. APLICACION DE LA CLAR AL ANALISIS DE COMPONENTES FENOLICOS DEL GENERO <i>EUCALYPTUS</i> .....	149
4. METODOLOGIA.....	149
4.1. ENSAYOS PRELIMINARES.....	149
4.2. ESTUDIO POR CLAR DE LA EFICACIA DE LOS METODOS DE EXTRACCION.....	153
4.3. METODO DEFINITIVO.....	154
 <b>VII. IDENTIFICACION DE COMPUESTOS FENOLICOS</b>	 158
1. IDENTIFICACIONES DIRECTAS POR CLAR.....	159
2. IDENTIFICACIONES POR CROMATOGRAFIA DE GASES- ESPECTROMETRIA DE MASAS.....	160
3. RECONOCIMIENTO DE GLICOSIDOS FENOLICOS.....	161
3.1. TECNICAS DE HIDROLISIS.....	161

3.1.1. Antecedentes bibliográficos.....	161
3.1.2. Metodología.....	165
3.2. ANALISIS DE AGLICONES. DETERMINACION DE LA POSICION DE UNION DEL AZUCAR.....	167
3.3. ANALISIS DE AZUCARES.....	169
3.3.1. Análisis de azúcares por CCF.....	169
3.3.2. Análisis de azúcares por CLAR.....	172
3.3.3. Análisis de azúcares por CG-EM.....	175
 <b>VIII. VALORACIONES CUANTITATIVAS Y SEMICUANTITATIVAS.....</b>	 184
1. VALORACIONES CUANTITATIVAS.....	185
1.1. METODO DE DETERMINACION DE FENOLES TOTALES DE FOLIN-CIOCALTEU.....	185
1.2. VALORACION CUANTITATIVA POR CLAR.....	186
2. VALORACIONES SEMICUANTITATIVAS.....	188
 <b>IX. ANALISIS NUMERICO.....</b>	 189
 <b>X. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	 194
1. <i>EUCALYPTUS CAMALDULENSIS</i> DEHNH.....	195
1.1. CARACTERIZACION DE MUESTRAS.....	195
1.1.1. Caracterización de hojas. Análisis de aceites esenciales.....	195
1.1.2. Caracterización de maderas. Determinaciones químicas. Normas.....	198
1.1.3. Conclusiones.....	201
1.2. EXTRACCION. VALORACION DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN LOS EXTRACTOS.....	201
1.2.1. Madera.....	202
1.2.2. Corteza.....	203
1.2.3. Hojas.....	204
1.2.4. Conclusiones.....	204
1.3. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	205
1.3.1. Madera.....	206
1.3.2. Corteza.....	209
1.3.3. Hojas.....	211

1.3.4. Conclusiones.....	214
1.4. ANALISIS POR CLAR.	
IDENTIFICACIONES POR CLAR Y CG-EM.....	214
1.4.1. Madera.....	215
1.4.2. Corteza.....	222
1.4.3. Hojas.....	226
1.4.4. Conclusiones.....	234
1.5. VALORACIONES CUANTITATIVAS.....	235
2. <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i> LABILL.....	238
2.1. CARACTERIZACION DE MUESTRAS.....	238
2.1.1. Caracterización de hojas. Análisis de aceites esenciales.....	238
2.1.2. Caracterización de maderas. Determinaciones químicas. Normas.....	241
2.1.3. Conclusiones.....	243
2.2. EXTRACCION. VALORACION DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN LOS EXTRACTOS.....	243
2.2.1. Madera.....	244
2.2.2. Corteza.....	244
2.2.3. Hojas.....	245
2.2.4. Conclusiones.....	246
2.3. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	246
2.3.1. Madera.....	247
2.3.2. Corteza.....	249
2.3.3. Hojas.....	252
2.3.4. Conclusiones.....	254
2.4. ANALISIS POR CLAR.	
IDENTIFICACIONES POR CLAR Y CG-EM.....	255
2.4.1. Madera.....	255
2.4.2. Corteza.....	258
2.4.3. Hojas.....	262
2.4.4. Conclusiones.....	266
2.5. VALORACIONES CUANTITATIVAS.....	266
3. <i>EUCALYPTUS RUDIS</i> ENDL.....	270
3.1. CARACTERIZACION DE MUESTRAS.....	270
3.1.1. Caracterización de hojas. Análisis de aceites esenciales.....	270



3.1.2. Caracterización de maderas.	
Determinaciones químicas. Normas.....	273
3.1.3. Conclusiones.....	275
3.2. EXTRACCION. VALORACION DEL CONTENIDO DE	
FENOLES TOTALES EN LOS EXTRACTOS.....	275
3.2.1. Madera.....	276
3.2.2. Corteza.....	276
3.2.3. Hojas.....	277
3.2.4. Conclusiones.....	278
3.3. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	278
3.3.1. Madera.....	279
3.3.2. Corteza.....	281
3.3.3. Hojas.....	283
3.3.4. Conclusiones.....	285
3.4. ANALISIS POR CLAR.	
IDENTIFICACIONES POR CLAR Y CG-EM.....	286
3.4.1. Madera.....	286
3.4.2. Corteza.....	289
3.4.3. Hojas.....	296
3.4.4. Conclusiones.....	300
3.5. VALORACIONES CUANTITATIVAS.....	300
4. RESULTADOS DE LOS ANALISIS NUMERICOS.....	303
4.1. ANALISIS UNIVARIANTE.....	303
4.2. ANALISIS MULTIVARIANTE.....	313
<b>XI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>325</b>
<b>XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>330</b>
<b>APENDICES.....</b>	<b>369</b>
APENDICE I. NOMENCLATURA I.U.P.A.C. Y PROCEDENCIA	
COMERCIAL DE PATRONES.....	370
APENDICE II. AREAS DE LOS PICOS CROMATOGRAFICOS	
EN LOS EXTRACTOS DE MADERA, CORTEZA Y HOJAS DE	
<i>E. CAMALDULENSIS</i> , <i>E. GLOBULUS</i> Y <i>E. RUDIS</i> .....	377

## **I. OBJETIVOS**

## I. OBJETIVOS

En España, se cultivan extensivamente varias especies de eucaliptos, principalmente *E. globulus* Labill. y *E. camaldulensis* Dehnh., como materia prima de las fábricas de pasta de celulosa y papel. Además, existen arboretos, diseminados por toda la geografía española, donde se cultivan de forma experimental numerosas especies de este género.

En los estudios realizados, en el INIA, sobre el comportamiento de distintas especies de eucaliptos, de varias procedencias, en el proceso de obtención de pasta de celulosa (BUSTAMANTE EZPELETA y SANTOS VIQUEIRA, 1983), se ha establecido que la madera de *E. globulus* es la que mejores propiedades presenta, mientras que *E. camaldulensis* muestra calidad intermedia y *E. rudis* Endl. calidad baja.

Se ha comprobado que existen diferencias no sólo entre árboles de distinta especie, sino también, frecuentemente, entre los de una misma especie, cultivados en distintas localidades, y hasta entre los de una misma población. Estas diferencias de comportamiento podrían explicarse si existieran distintas "razas" químicas (quimiotipos) en la especie en cuestión, denominadas inicialmente "variedades fisiológicas", de origen genético.

Se considera que los polifenoles, como los aceites esenciales contenidos en las hojas, son buenos caracteres quimiotaxonómicos. HILLIS e ISOI (1965) establecieron en *E. sideroxylon* dos quimiovariedades (una flavónica y otra estilbénica), basándose en la distinta composición en los polifenoles de las hojas de varios individuos de esta especie. ABD-ALLA et al. (1980) dedujeron la existencia de dos "razas" químicas en *E. camaldulensis*, basándose asimismo en el contenido de glicósidos flavónicos en sus hojas. También se ha observado una correlación entre la distribución de antocianinas en las hojas y la corteza de varias especies del género *Eucalyptus* y su clasificación taxonómica (SHARMA y CROWDEN, 1974).

Por otra parte, es conocida la acción inhibidora de algunos polifenoles, presentes en la madera de algunas especies de *Pinus*, sobre el proceso de obtención de pasta de papel (HILLIS, 1962). Entre ellos, están dos flavonoides (catequina y taxifolina). Parece que su acción es muy diferente. La catequina (flavanol) inhibe la deslignificación de la madera, mediante la formación de productos de condensación lignina-fenol. La taxifolina (dihidroflavanol) reduce el bisulfito, presente en la lejía de cocción, utilizada para la deslignificación de la madera. No hemos encontrado referencias al comportamiento de otros grupos de flavonoides que podrían estar presentes también en la madera de distintos eucaliptos.

Se sospecha asimismo que ciertos ácidos fenólicos, como los ácidos gálico y elágico y derivados de estos, pueden ser causantes de fenómenos de corrosión y otros problemas que se presentan en los procesos de fabricación de pasta de eucalipto (STEWART, 1969). Por ejemplo, el aumento de viscosidad durante la concentración de las lejías residuales, como consecuencia del cual se forma un producto granulado que origina incrustaciones en las tuberías (MCLEAN y GARDNER, 1953). Estas sustancias también parecen estar relacionadas con los depósitos de color verde que se originan en los cambiadores de calor de los hervidores y en las holandesas de blanqueo.

Otros componentes polifenólicos, como los taninos, por su tendencia a reaccionar con sales metálicas formando complejos coloreados, pueden ocasionar algunos otros problemas que tienen mayor importancia en la pasta mecánica (BUSTAMANTE EZPELETA y SANTOS VIQUEIRA, 1983).

Se atribuye a los polifenoles una importante acción fungicida, bactericida e insecticida, así como diversas aplicaciones farmacológicas. Por estas propiedades, las ramillas y cortezas de los eucaliptos (productos de desecho de la industria papelera) podrían ser aprovechadas para la obtención de plaguicidas naturales, no tóxicos para el hombre, o de productos

de interés farmacológico.

Partiendo de estas premisas, se han establecido los siguientes objetivos para el trabajo de Tesis propuesto:

1. Puesta a punto de métodos de extracción, que combinen la preservación de la estructura de los componentes polifenólicos con un buen rendimiento extractivo, así como de las técnicas analíticas más apropiadas para la identificación y valoración de estos compuestos.

2. Estudio comparativo de la composición polifenólica de la madera, corteza y hojas de tres especies de *Eucalyptus*: *E. camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*, centrado en el análisis de flavonoides y compuestos fenólicos de bajo peso molecular (ácidos y aldehídos fenólicos, fundamentalmente). No tenemos conocimiento de que se haya realizado una investigación conjunta de estos compuestos en estas tres partes de la planta. El conocimiento de la dotación polifenólica individualizada de cada una de estas partes del árbol permitirá conocer la viabilidad o no del aprovechamiento de los residuos forestales e industriales de los eucaliptos estudiados - ramillas y cortezas, fundamentalmente - para la obtención de materias primas para las industrias farmacéutica y química.

3. Contribución al establecimiento de perfiles de composición polifenólica que permitan la diferenciación de especies, o incluso de táxones subespecíficos (quimiotipos). Se pretende correlacionar el efecto discriminante de este tipo de compuestos con el de los terpenos de las hojas, ampliamente utilizados como marcadores taxonómicos.

4. Determinar si existe relación entre la composición polifenólica de la madera y su aptitud para la producción de pasta de papel.

## **II . INTRODUCCION**

## II. INTRODUCCION

### 1. CLASIFICACION BOTANICA Y MORFOLOGIA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

#### 1. 1. CLASIFICACION BOTANICA

El género *Eucalyptus* L' Her. pertenece a la familia de las *Myrtaceae* (dentro del Orden *Myrtales*). Esta familia contiene, aproximadamente, 100 géneros y alrededor de 3000 especies. Su porte comprende desde matas y pequeños arbustos hasta enormes árboles de *Eucalyptus* (HEYWOOD, 1985).

La familia *Myrtaceae* habita, principalmente, en las áreas tropical y subtropical, con centros de dispersión en América y este y suroeste de Australia.

Está dividida en dos subfamilias: *Myrtoideae* y *Leptospermoideae* (PENFOLD y WILLIS, 1961). De ellas, la subfamilia *Leptospermoideae* comprende dos tribus: *Leptospermeae* y *Chamaelaucieae*. A su vez, se reconocen seis subtribus dentro de las *Leptospermeae*: *Backhousiinae*, *Metrosiderinae*, *Eucalyptinae*, *Leptosperminae*, *Calothamninae* y *Baeckeinae*.

La subtribu *Eucalyptinae* abarca sólo dos géneros: *Angophora* y *Eucalyptus*.

Las clasificaciones más extendidas, dentro del género *Eucalyptus*, se han desarrollado en función de la forma de sus anteras, dado que los demás caracteres morfológicos varían tan ampliamente que no sería posible encontrar un sistema satisfactorio de agrupamiento.

Estas clasificaciones establecen seis secciones principales con diversas subsecciones:

#### A. *Renantherae*

##### a. *Alpinae*

- b. *Brachyandrae*
- B. *Renantheroideae*
- C. *Porantheroideae*
- D. *Terminales*
- E. *Plathyantherae*
  - a. *Graciles*
  - b. *Pyriformes*
- F. *Macrantherae*
  - a. *Tereticornes*
  - b. *Longiores*
- G. *Macrantherae (Normales)*

De las especies, objeto de este estudio, *E. camaldulensis* y *E. rudis* se encuentran, dentro de la sección *Macrantherae*, en la subsección *Tereticornes* y en la serie *Exsertae*, una de las tres series que componen dicha subsección. El *E. globulus* se encuentra, dentro de la sección *Macrantherae (Normales)*, en la serie *Globulares*, una de las seis series que constituyen esta sección.

## 1. 2. MORFOLOGÍA

La familia de las *Myrtaceae* son plantas leñosas, desde arbustos a grandes árboles. Sus hojas son simples, generalmente opuestas (alguna vez alternas), coriáceas, persistentes y enteras, sin estípulas y con punteaduras diáfanas, debidas a glándulas subepidérmicas (que también se encuentran sobre los tallos jóvenes, piezas florales y frutos), que segregan aceites esenciales (HEYWOOD, 1985).

Sus flores son regulares, bisexuales, en inflorescencias, la mayoría de las veces cimosas y pocas veces racemosas, raramente solitarias; habitualmente, presentan 4 ó 5 sépalos, casi siempre libres (algunas veces más o menos soldados, formando una caperuza que se desprende al abrirse la flor), suelen ser muy reducidos o virtualmente, ausentes; tienen 4 ó 5 pétalos libres, pequeños y redondos; los estambres son numerosos (rara vez pocos),



ocasionalmente, en manojos opuestos a los pétalos, libres, con anteras versátiles; ovario, comúnmente, ínfero, con numerosas cavidades (a menudo 2-5), cada una con dos o múltiples óvulos sobre placentas axilares (raramente parietales); estilo largo y simple, con estigma capitado (HEYWOOD, 1985; POLUNIN, 1977).

El fruto es, generalmente, una baya carnosa, una cápsula o una nuez; las semillas con poco o nada de endospermo.

En cuanto al género *Eucalyptus*, los especímenes se caracterizan por presentar una tremenda variabilidad en tamaño, desde pequeños arbustos, llamados "mallees" o "marlocks", hasta grandes árboles (PENFOLD y WILLIS, 1961).

#### MADERA Y CORTEZA

Los componentes de la madera se originan a partir de una capa de células, llamada *cambium*, que se extiende desde las ramas hasta las raíces. El *cambium* posee la capacidad de división celular, y es capaz de producir nuevas células continuamente; aquellas que se originan hacia dentro del tronco, forman la madera o xilema, y las que se originan hacia fuera, forman la corteza interna o floema. El xilema se encarga de la conducción de agua desde las raíces hasta las hojas, y el floema, de la conducción de los componentes orgánicos, sintetizados en las hojas, hasta el resto de la planta. Dispuestos de forma radial, existen grupos de células conocidas con el nombre de haces medulares, que sirven para conectar horizontalmente las diferentes capas de la madera con el floema.

La madera de *Eucalyptus* se clasifica dentro del grupo de las maderas de frondosas, que se diferencia de las maderas de coníferas por la presencia de unos vasos o poros, semejantes a las traqueidas de estas, pero que, en el caso de las frondosas, están formados por una serie de células de paredes finas, en las que la pared terminal se ha roto dando lugar a un tubo más o menos continuo.

La madera puede considerarse dividida en:

- Albura: la parte externa de color más claro. Fisiológicamente es la parte viva de la madera.
- Corazón o duramen: parte interna, más oscura.

Basándose en la anatomía de la madera, se han reconocido dos grupos de *Eucalyptus* (INGLE y DADSWELL, 1953). El grupo A incluye la mayoría de los eucaliptos, mientras el grupo B incluye las series *Corymbosae-Peltatae* y *Corymbosae*. Esta clasificación se basa en la distribución del parénquima (tejido fundamental) y el agrupamiento de los vasos.

En cuanto a la composición de la madera, junto a los dos componentes químicos principales, lignina y celulosa, existe una gran variedad de componentes minoritarios como azúcares, almidón, resinas, ceras, polifenoles, aceites esenciales, minerales y "kinos" (materiales resinosos que contienen taninos).

Existe una gran variedad de tipos de corteza dentro del género *Eucalyptus*, pero la mayor parte de estos se pueden clasificar en seis grupos principales:

- Teseladas ("Bloodwoods")
- Lisas ("Gums")
- Fibrosas ("Boxes")
- De fibra corta y estrecha ("Peppermints")
- De fibra larga ("Stringbarks")
- Oscuras, con grandes fisuras ("Ironbarks").

## HOJAS

Las hojas de los eucaliptos muestran dos características importantes. En primer lugar, cada árbol desarrolla diferentes tipos de hojas en las distintas etapas de su ciclo vital. Y, en segundo lugar, la copa de hojas de los eucaliptos se origina con una inusual rapidez. Esto es debido a la presencia de brotes

desnudos que capacitan al árbol para desarrollar una gran cantidad de ramas en pocas semanas. Incluso si la copa se ha destruido parcial o totalmente, el sistema de reserva de brotes permite la elaboración de follaje en un corto período de tiempo.

Los tipos de hojas, correspondientes a las distintas etapas de evolución del árbol, son, en orden a su desarrollo:

- 1) Cotiledones
- 2) Hojas juveniles
- 3) Hojas intermedias
- 4) Hojas adultas

En la germinación, las semillas de los eucaliptos desarrollan dos cotiledones que son característicos de las series a las que pertenecen las especies, y que pueden servir como marcadores de diagnóstico.

Las hojas juveniles son opuestas, ligeramente pecioladas, a menudo glaucas; muchas veces, se forman en los árboles adultos en respuesta a una lesión. El paso de juveniles a adultas no suele ser brusco, sino que tiene lugar en unas series de hojas que muestran una transición gradual de forma; se les llama hojas intermedias.

Las hojas adultas suelen ser alternas, pecioladas, resistentes, rígidas, con una vena intermarginal ancha.

### FLORES Y FRUTOS

Las flores son solitarias o agrupadas en umbelas, con pétalos y sépalos soldados, formando un casquete u opérculo sobre el botón, que se desprende cuando la flor se abre. Presentan numerosos estambres. El ovario tiene 2-8 lóculos, y el estilo es alargado.

El fruto se presenta en cápsula, enmarcada por valvas que se

describen como abiertas cuando se proyectan hacia el borde de la cápsula, o cerradas cuando se dirigen hacia el centro.

Las características de las especies, objeto de nuestro estudio, son:

***E. camaldulensis* Dehnh.**

En la figura I.1 se representan los caracteres morfológicos y la distribución, en España, de esta especie (DE LA LAMA GUTIERREZ, 1976).

Puede alcanzar una altura de 40 m, con un tronco corto, macizo y copa extendida. Alcanza su mejor desarrollo en suelos profundos, fangosos con subsuelo arcilloso.

- Corteza. Lisa, moteada con manchas amarillas y grises. Se descorteza en tiras o placas.

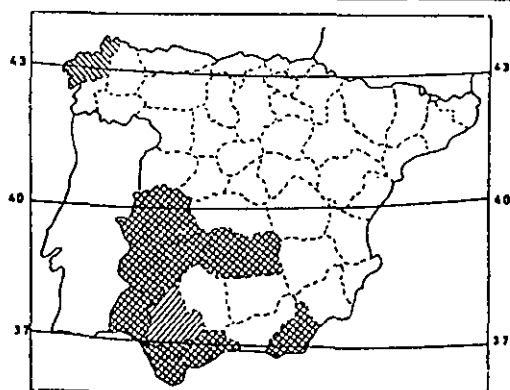
- Hojas juveniles. Opuestas, 6-9 x 2,5-4 cm, lanceoladas anchas a ovadas, glaucas, pecioladas, sesiles, abrazadoras.

- Hojas adultas. Alternas, 12-22 x 0,8-1,5 cm, lanceoladas estrechas a lanceoladas, acuminadas.

- Inflorescencias. En umbelas de 5-10 flores en un pedúnculo de 6-15 mm. Brotes de 6-10 x 4-5 mm, en largos pedicelos. Opérculo rostrado o cónico.

- Frutos. Pedicelados, de 7-8 x 5-6 mm, hemisféricos, con valvas abiertas.

Es una especie de madera, relativamente comercial, que produce un excelente carbón, y está incluida en el grupo 3º de la clasificación de BUSTAMANTE EZPELETA y SANTOS VIQUEIRA (1983). Crece rápidamente, y se regenera bien. Es muy ornamental, sobre todo, la variedad "péndula". Tiene gran interés apícola, por la






-  En masas arbóreas
-  En arboretos
-  En ambas formas

Figura I.1.: Caracteres morfológicos y distribución en España de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (tomado de DE LA LAMA GUTIERREZ, 1976).

floración casi permanente y la buena miel que produce.

*E. globulus* Labill.

En la figura I.2, se representan los caracteres morfológicos y la distribución de esta especie en España (PENFOLD y WILLIS, 1961; DE LA LAMA GUTIERREZ, 1976).

Se trata de árboles que pueden alcanzar una altura de 55 m en Australia, mientras, en España, sobrepasa frecuentemente los 60 m, conociéndose ejemplares hasta de 67 m.

- Corteza. La corteza de tronco es, primero, blanquecina, plateada o azul-pruinosa, lisa; luego, grisácea, amarillenta y al fin, parda grisácea. Cae anualmente en largas bandas coriáceas abarquilladas que cuelgan, algún tiempo, de la parte alta del tronco y, del arranque de las primeras ramas. En las patillas de la cepa y base del tronco, es persistente, gris-oscuro y, a veces, se hiende en placas longitudinales (RUIZ DE LA TORRE, 1979).

- Hojas juveniles. Opuestas para un gran número de pares, de 7-16 x 4-9 cm, lanceoladas anchas a ovadas, cordiformes, glaucas y concoloras.

- Hojas adultas. Alternas, de 10-30 x 3-4 cm, falcadas, verdes oscuras, concoloras, coriáceas, pecioladas.

- Inflorescencias. Axilares, solitarias, ocasionalmente en umbelas de 3 flores, con pedúnculo corto o rudimentario. Brotes de 30 x 20 mm, glaucos. Opérculo hemisférico.

- Frutos. De 10-15 x 15-30 mm, de forma globular a cónica ancha, con 4 bordes principales; las valvas suelen estar cubiertas por un disco.

La madera se usa comercialmente. Su celulosa es la mejor de

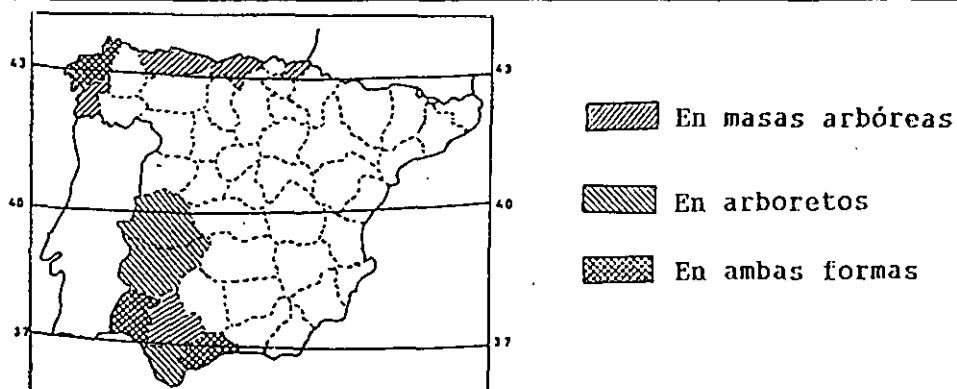
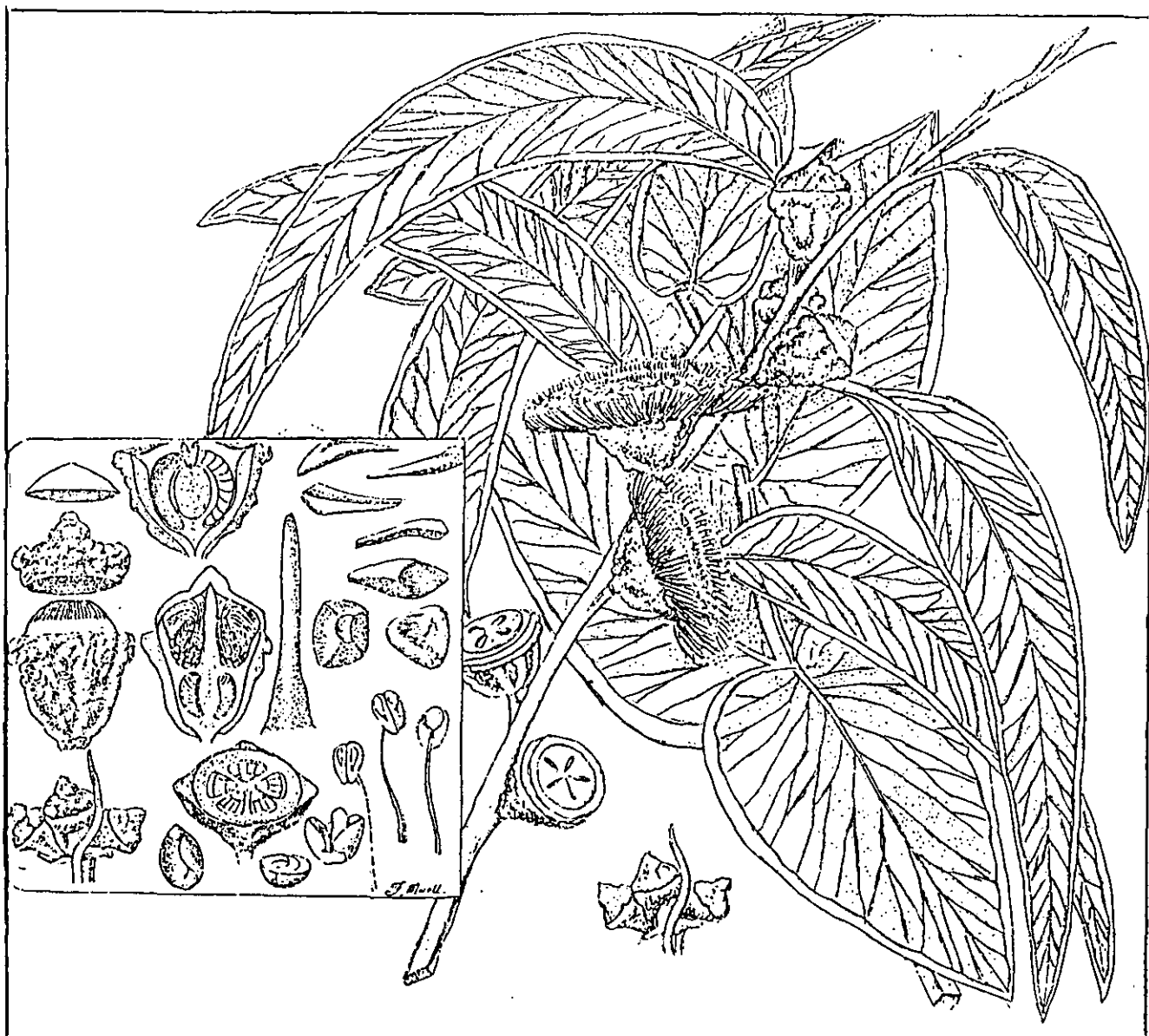


Figura I.2: Caracteres morfológicos y distribución en España de *Eucalyptus globulus* Labill. (tomado de PENFOLD y WILLIS, 1961, y DE LA LAMA GUTIERREZ, 1976).

eucalipto en Europa (grupo 1º de la clasificación de BUSTAMANTE EZPELETA y SANTOS VIQUEIRA, 1983). El blanqueo es fácil: requiere bajo consumo de cloro. Da la mejor pasta noble (pasta química para disolver) de todas las frondosas, junto con algunos congéneres de maderas claras; mucho mejor que la del haya, que fue la más utilizada antaño. En la obtención de pasta química para papel, es más ventajosa que la de *E. camaldulensis*, por su más fácil cocción, libertad de elección de proceso y por suministrar una pasta homogénea y clara, de mejores características químicas y mecánicas. *E. globulus* da mayor porcentaje de corteza que *E. camaldulensis*, pero aquélla puede ser incorporada, en ciertas condiciones, al proceso de obtención de pasta, sin merma de las cualidades mecánicas de la misma, que es superior a la de otras frondosas o paja, por ser la fibra más larga, mayor su resistencia al desgarró y su blancura, etc. Al bisulfito, se obtienen pastas para papeles buenos y al sulfato, pastas para kraft, mezclándose siempre con pasta de coníferas. En España, se obtiene pasta blanca para textil de buena calidad.

Sus hojas se destilan para la obtención de aceites esenciales. Esta especie se utiliza también como árbol ornamental, por los contrastes de color entre sus hojas primarias y adultas.

#### *E. rudis* Endl.

La figura I.3 muestra los caracteres morfológicos y la distribución de esta especie en España (DE LA LAMA GUTIERREZ, 1976).

Árbol de altura aproximada a los 15 m, con tronco corto y ramas extendidas.

- Corteza. Rugosa y persistente en el tronco y lisa en las ramas; fácilmente descortezable en las ramas.

- Hojas juveniles. Opuestas para 4 o más pares, de 10 x 7,5 cm,





Figura I.3: Caracteres morfológicos y distribución en España de *Eucalyptus rudis* Endl. (tomado de DE LA LAMA GUTIERREZ, 1976).

ovadas a orbiculares, ligeramente glaucas, con cortos peciolo.

- Hojas adultas. Alternas, de 10-15 x 1-4 cm, lanceoladas estrechas a anchas, falcadas, concoloras, pecioladas.

- Inflorescencias. Umbelas de 4-10 flores, con pedúnculo de 10-15 cm. Brotes de 9-12 x 5-9 mm, pedicelados. Opérculo cónico o rostrado.

- Frutos. Pedicelados, de 5-9 x 10-12 mm, hemisféricos o campanulados. 4 ó 5 valvas abiertas con disco ancho, plano o convexo.

Su madera marrón-rojiza, correspondiente al grupo 4º de la clasificación de BUSTAMANTE EZPELETA y SANTOS VIQUEIRA (1983), es de peores características que la de *E. camaldulensis*.

## 2. COMPUESTOS FENOLICOS

### 2.1. DISTRIBUCION DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS EN LOS VEGETALES

Los compuestos fenólicos, así como los alcaloides, terpenoides y esteroides son los constituyentes más importantes del metabolismo secundario de los seres vivos, estando los dos primeros grupos de compuestos restringidos al reino vegetal.

Los compuestos fenólicos se encuentran difundidos en el reino vegetal, pero la clase de compuestos presente varía considerablemente con la especie considerada. Los compuestos fenólicos no son comunes en las bacterias, hongos y algas, y son pocas las clases de fenoles en ellos reconocidas. Los flavonoides están casi completamente ausentes, aunque se ha detectado la producción de un derivado de la gossipetina por *Aspergillus candidus* (GOTTLIEB, 1975). Aunque los hongos y las algas, a menudo, no son capaces por si mismos de sintetizar fenoles, en su asociación simbiótica, los líquenes, producen diversas sustancias fenólicas que pueden ser coloreadas. Las sustancias más características de los líquenes son los dépsidos y depsidonas, aunque pueden producir otras clases de fenoles más comunes, como xantonas o antraquinonas (CULBERSON *et al.*, 1977).

Los briofitos son productores regulares de polifenoles y, en ellos, se ha detectado una amplia variedad de flavonoides corrientes. No obstante, sólo aproximadamente un 50 % de las especies analizadas, contienen flavonoides y, en el resto, están ausentes o presentes en calidad de trazas (MARKHAM, 1988).

Es en las plantas vasculares en las que puede encontrarse una variedad más completa de polifenoles. Todos los helechos, gimnospermas y angiospermas contienen lignina en la pared celular, y los precursores de las ligninas son, en origen, de tipo fenilpropanoide. Los ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos y los flavonoides están muy extendidos, pero

algunas clases de fenoles tienen una distribución más discreta. Entre ellos, se pueden destacar los isoflavonoides (confinados a las leguminosas), las antraquinonas (reconocidas en seis familias aproximadamente) y las xantonas (principalmente, en *Gentianaceae*, *Guttifereae*, *Moraceae* y *Polygalaceae*) (HARBORNE, 1989).

## 2.2. ESTRUCTURA Y DESCRIPCION QUIMICA

Bajo el término de polifenoles o compuestos fenólicos se engloba un gran número de sustancias sumamente heterogéneas, caracterizadas por poseer en su estructura uno o varios anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo, como sustituyentes.

De acuerdo con la clasificación de HARBORNE y SIMMONDS (1964), los compuestos fenólicos más abundantes en la naturaleza son los de estructuras:

- $C_6$  - Fenoles sencillos
- $C_6-C_1$  - Ácidos, aldehídos benzoicos y alcoholes bencílicos
- $C_6-C_2$  - Acetofenonas y alcoholes fenilacéticos
- $C_6-C_3$  - Ácidos cinámicos y compuestos relacionados: cumarinas, isocumarinas y cromonas.
- $C_6-C_3-C_6$  - Flavonoides

Y, como compuestos fenólicos minoritarios:

- $C_6$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{14}$  - Quinonas
- $C_6-C_1-C_6$  - Benzofenonas, quinonas
- $C_6-C_2-C_6$  - Estilbenos
- $C_{18}$  - Betacianinas y betaxantinas
- $C_{30}$  - Biflavonoides

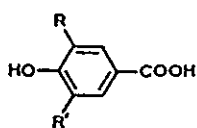
Objeto de este estudio de Tesis son los ácidos, aldehídos y alcoholes fenólicos de los tipos  $C_6-C_1$  y  $C_6-C_3$ , así como los compuestos  $C_6-C_3-C_6$ , es decir, el amplio grupo de los flavonoides.

A continuación, se describen las estructuras químicas de

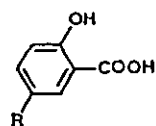
cada uno de estos grupos.

### 2.2.1. Ácidos y aldehídos benzoicos y alcoholes bencílicos C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>

La estructura de los ácidos benzoicos más frecuentes (ácidos p-hidroxibenzoico, protocatéquico, vainílico, gálico y sirínico) aparecen a continuación. A ellos se unen los ácidos salicílico y gentísico, que presentan un OH en orto respecto a la función ácida.



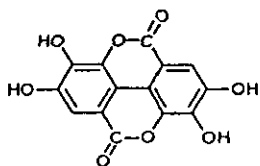
R=R'=H Ácido p-hidroxibenzoico  
R=OH R'=H Ácido protocatéquico  
R=OCH<sub>3</sub> R'=H Ácido vainílico  
R=R'=OH Ácido gálico  
R=R'=OCH<sub>3</sub> Ácido sirínico



R=H Ácido salicílico  
(ácido o-hidroxibenzoico)  
R=OH Ácido gentísico

Los ácidos p-hidroxibenzoico, vainílico y sirínico son constituyentes de la lignina, de la que se liberan por hidrólisis alcalina. Se puede decir, en una primera aproximación, que plantas que no contienen lignina, no contienen tampoco esos ácidos (HARBORNE y SIMMONDS, 1964).

Los ácidos protocatéquico y gálico tienen origen y funciones diferentes al resto de los ácidos benzoicos. El primero está bastante extendido, y el segundo es menos abundante, pudiendo aparecer como su dímero, el ácido elágico, que es la lactona del ácido hexahidroxidifénico.

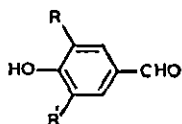


Ácido elágico

Los ácidos gálico y elágico juegan un papel importante en la estructura de ciertos taninos, de los que se liberan por hidrólisis ácida.

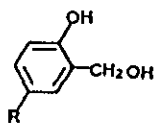
Existe otra serie de ácidos, encontrados sólo ocasionalmente en la naturaleza, entre los que se pueden destacar los ácidos completamente metoxilados: ácido anísico (ácido *p*-metoxibenzoico), ácido verátrico (ácido 3,4-dimetoxibenzoico) y el ácido eudésmico o trimetilgálico (ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico).

Los aldehídos *p*-hidroxibenzoico, vainílico (vainillina), sirínico o, al menos, los compuestos que liberan estos por hidrólisis alcalina, han sido relacionados con la estructura de la lignina en madera de coníferas (PEARL, 1958).



R=R'=H Aldehído *p*-hidroxibenzoico  
 R=H R'=OCH<sub>3</sub> Vainillina  
 R=R'=OCH<sub>3</sub> Aldehído sirínico

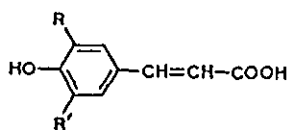
Los alcoholes derivados de los ácidos benzoicos son, relativamente, poco frecuentes (alcoholes salicílico y gentísico).



R=H Alcohol salicílico  
 R=OH Alcohol gentísico

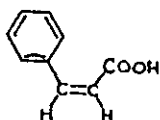
### 2.2.2. Ácidos cinámicos y compuestos asociados

Son cuatro los ácidos cinámicos bien conocidos y ampliamente repartidos en los vegetales. Son los ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico. Prácticamente todos los órganos vegetales contienen al menos uno de estos ácidos (RIBEREAU-GAYON, 1968).

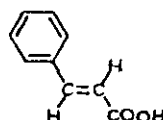


$R=R'=H$  Acido p-cumárico  
 $R=OH$   $R'=H$  Acido caféico  
 $R=OCH_3$   $R'=H$  Acido ferúlico  
 $R=R'=OCH_3$  Acido sinápico

El doble enlace determina la existencia de dos isómeros, *cis* y *trans*. Los ácidos cinámicos naturales son *trans*, que es la forma más estable, aunque pueden transformarse en la *cis* por efecto de la luz o en solución.

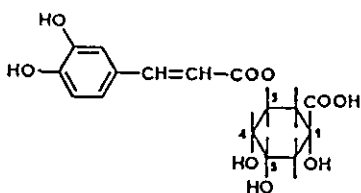


*cis*



*trans*

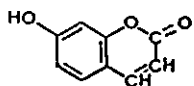
Las combinaciones de los ácidos cinámicos, normalmente en forma de éster, están muy extendidas en el reino vegetal. Se conocen combinaciones con los ácidos quínico y tartárico, con azúcares y antocianos acilados. El ácido clorogénico (éster del ácido caféico con el ácido quínico) es la combinación más conocida.



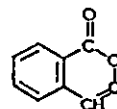
Acido clorogénico

Los ácidos o-hidroxicinámicos se ciclan con facilidad,

originando las cumarinas, que, por lo tanto, también pertenecen al grupo de las estructuras  $C_6-C_3$ , en las que la cadena  $C_3$  queda como un heterociclo oxigenado. Ejemplo de cumarinas es la umbeliferona.



Umbeliferona

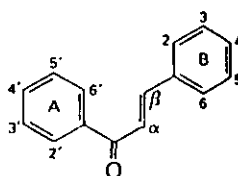
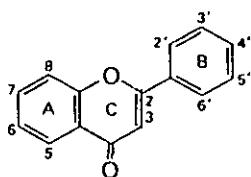


Isocumarina

Existen también estructuras como las isocumarinas, aunque son muy poco frecuentes. Cumarinas e isocumarinas se diferencian en las posiciones relativas de los grupos O y CO en el heterociclo; ambas están emparentadas químicamente con las cromonas.

### 2.2.3. Flavonoides

En las plantas, los aglicones flavonoídicos (es decir, flavonoides que no llevan unido un azúcar) se presentan en una amplia variedad de formas estructurales. Todos contienen un núcleo básico de 15 átomos de carbono, dispuestos en una configuración  $C_6-C_3-C_6$ , con dos anillos aromáticos enlazados por una unidad de tres carbonos, que pueden o no, quedar cerrados formando un tercer anillo. Por convenio, estos anillos se llaman A, B y C, y a los átomos de carbono individuales se les asigna un sistema de numeración que utiliza números para los anillos A y C, y números "con prima" para el B. El sistema de numeración se modifica para el caso de las chalconas, en las que la unidad central de tres átomos de carbono no se cierra en un anillo.





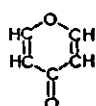
Según su estructura, los flavonoides se pueden clasificar en:

## I. MONOMERICOS

La estructura de los distintos tipos de flavonoides varía según la naturaleza del heterociclo central oxigenado. Este heterociclo deriva de las fórmulas de pirano, *pirilium* o pirona:



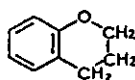
Pirano



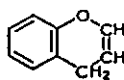
γ-Pirona



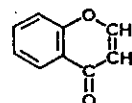
*Pirilium*



Cromano

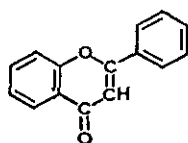


Cromeno

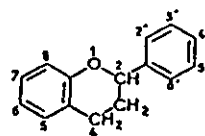


Cromona

### I.A. Con estructura de 2-arilcromona o 2-arilcromano

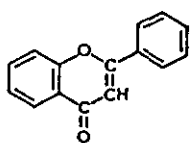


2-fenilcromona

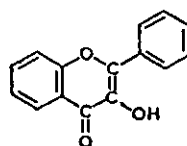


2-fenilcromano

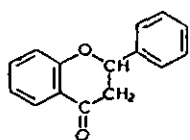
Las estructuras de flavonoides, derivadas de la 2-fenilcromona y del 2-fenilcromano, son:



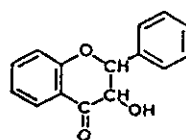
FLAVONA



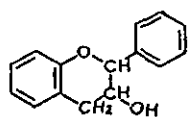
FLAVONOL



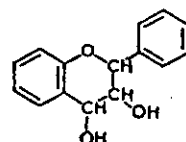
FLAVANONA  
(Dihidroflavona)



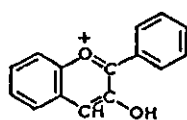
FLAVANONOL  
(Dihidroflavonol)



FLAVAN-3-OL  
(Catequina)



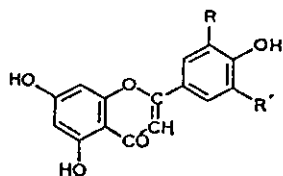
FLAVAN-3,4-DIOL  
(Leucoantocianidina)



ANTOCIANIDINA

Las características estructurales de cada una de estas familias, se basan en los distintos grados de oxidación del heterociclo, siendo los flavanoles los de menor grado de oxidación y los flavonoles, los de heterociclo más oxigenado.

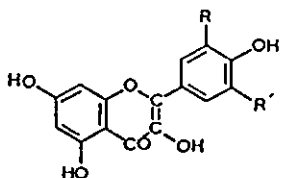
Entre las flavonas, los compuestos encontrados más frecuentemente son apigenina y luteolina.



R=R'=H Apigenina  
R=OH R'=H Luteolina

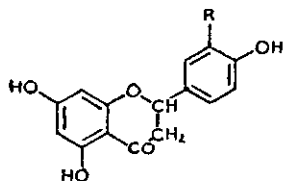
No suelen encontrarse en la naturaleza ni la flavona (estructura básica sin ningún tipo de sustituyentes), ni derivados con el anillo B trihidroxilado (RIBEREAU-GAYON, 1968).

Los flavonoles se diferencian de las flavonas en la existencia de un OH en C<sub>3</sub>. Este OH es el único que no es fenólico. Los flavonoles más extendidos son quercetina, kaempferol y miricetina. En estos compuestos, la metilación de los grupos OH es poco frecuente. Entre los flavonoles metilados, el más conocido es la isoramnetina.



R=R'=H Kaempferol  
R=OH, R'=H Quercetina  
R=R'=OH Miricetina  
R=OCH<sub>3</sub>, R'=H Isoramnetina

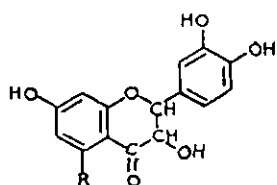
Las flavanonas derivan de las flavonas, por desaparición del doble enlace del heterociclo central. La naringenina y el eriodictyol, emparentadas con apigenina y luteolina, son los más frecuentes.



R=H Naringenina  
R=OH Eriodictyol

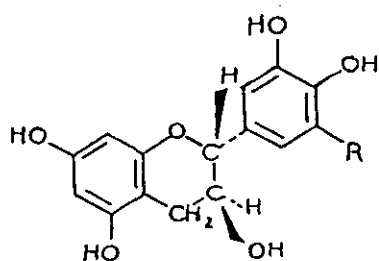
Estas estructuras se caracterizan por poseer un carbono asimétrico ( $C_2$ ), lo que entraña la existencia de dos isómeros ópticos para cada compuesto.

Entre las 3-hidroxi-flavanonas, denominadas también flavanonoles o 2,3-dihidroflavonoles, la más conocida es la taxifolina (o dihidroquercetina), presente en la madera de corazón de algunas especies.

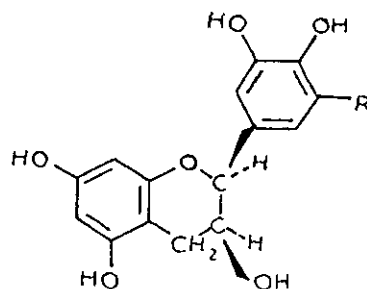


R=OH Taxifolina

Los flavan-3-oles se caracterizan por tener un hidroxilo en  $C_3$  y el anillo central, totalmente saturado. No existen en la naturaleza en forma heterosídica, al contrario que la mayoría de los compuestos fenólicos. Dentro de esta familia, existen varias sustancias con 1, 2 ó 3 grupos hidroxilo en el anillo lateral. A toda la familia se la conoce con el nombre de catequinas, aunque este término se refiere, más específicamente, a los compuestos con dos OH en el anillo lateral. Las estructuras más frecuentes son los estereoisómeros catequina y epicatequina, y galocatequina y epigalocatequina, cada una de las cuales tiene dos carbonos asimétricos y, por lo tanto, dos isómeros ópticos.

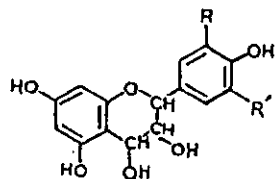


R=H Catequina  
R=OH Galocatequina



R=H Epicatequina  
R=OH Epigalocatequina

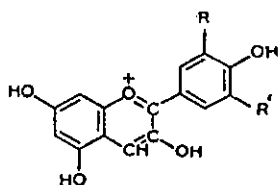
Desde 1920, el término de leucoantocianidina se utiliza para designar los productos naturales que tienen la propiedad de formar antocianidinas, por calentamiento en medio ácido. Se conocen también como flavan-3,4-dioles.



R=R'=H Leucoperlargonidina  
 R=OH, R'=H leucocianidina  
 R=R'=OH leucodelphinidina

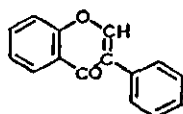
Posteriormente, FREUDENBERG y WEINGES (1962) designaron, con el nombre de proantocianidinas, a aquellas sustancias susceptibles de transformarse en antocianidinas, por calentamiento en medio ácido, lo que equivaldría a las leucoantocianidinas, tal y como se definieron anteriormente. Por último, HASLAM (1982) definió las leucoantocianidinas como monómeros de las proantocianidinas y las proantocianidinas condensadas, como los oligómeros de los flavan-3-oles. Las proantocianidinas condensadas constituyen el grupo de los taninos condensados, y se llama taninos hidrolizables a los polímeros de ésteres glucídicos de los ácidos gálico y elágico.

Las antocianidinas son ciertos pigmentos, rojos en medio ácido, que viran al azul en medio alcalino y en ciertas condiciones (formación de complejos con metales). Se encuentran mayoritariamente en flores y frutos, y se caracterizan por tener una estructura  $C_6-C_3-C_6$  en la que el anillo C está en forma de *pyrilium*. Se suelen presentar en la naturaleza como heterósidos, que se denominan antocianinas. Las más frecuentes son cianidina, delphinidina y malvidina.

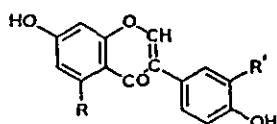


R=OH, R'=H Cianidina  
 R=R'=OH Delphinidina  
 R=R'=OCH<sub>3</sub> Malvidina

### I.B. Con estructura de 3-arilcromona, las isoflavonas

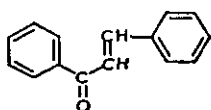


Las isoflavonas son isómeros de las flavonas, en las que el anillo bencénico lateral está unido a C<sub>3</sub>, en lugar de a C<sub>2</sub>. Como ejemplos:

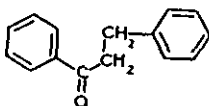


R=R'=H Daidzeína  
R=OH, R'=H Genisteína

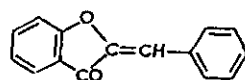
### I.C. Con dos ciclos hexagonales



CHALCONAS

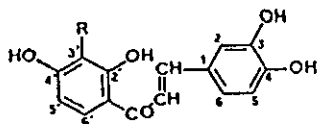


DIHIDROCHALCONAS

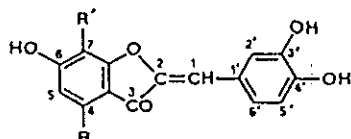


AURONAS

Las chalconas, dihidrochalconas y auronas son pigmentos cuya estructura difiere de todas las familias anteriores, en que los tres átomos de carbono que unen los dos ciclos bencénicos, en lugar de formar un heterociclo oxigenado de seis unidades, forman una cadena lineal, en los dos primeros casos o un heterociclo de cinco unidades, en el otro. Existen pocos compuestos conocidos dentro de estas familias; entre ellos, cabe destacar:



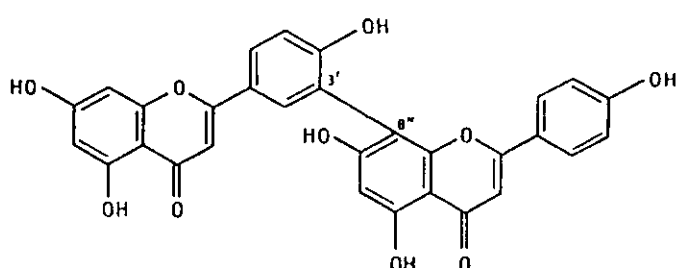
R=H Buteína  
R=OH Okanina



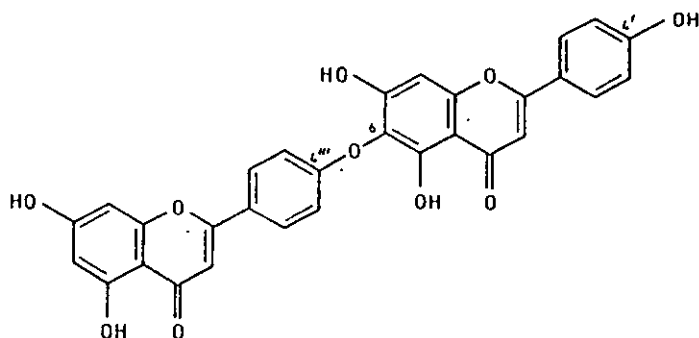
R=R'=H Sulfuretina  
R=OH, R'=H Aureisidina

## II. DIMERICOS. BIFLAVONOIDES

Son dímeros de flavonoide, aunque no se incluyen en este grupo, las procianidinas, dímeros de catequina. Suele tratarse de dímeros de flavona o flavanona, con un patrón de oxigenación 5,7,4', bastante simple biosintéticamente (algunas veces 5,7,3',4'). La unión interflavonoídica suele ser un enlace C-C o un enlace éter (GEIGER y QUINN, 1975). Los monómeros que intervienen en la estructura, pueden ser del mismo o de distinto tipo, y existe gran variedad de posiciones de enlace.



Amentoflavona



Hinokiflavona

## III. FLAVONOIDES GLICOSILADOS

Los flavonoides suelen encontrarse en la naturaleza en forma de glicósidos, que pueden clasificarse en dos grandes grupos:

### III.A. Flavonoides O-glicósidos

Uno o más de los grupos hidroxilo de la molécula del aglicón se encuentra unido al azúcar por un enlace

hemiacetálico, sensible a ácidos. Como consecuencia de la glicosilación, el flavonoide se vuelve menos reactivo y más soluble en agua. Esta última propiedad permite su almacenamiento en las vacuolas celulares, donde suelen acumularse.

Aunque, en principio, un hidroxilo en cualquier posición del anillo puede ser glicosilado, parece que, de hecho, existen ciertas posiciones en las que la probabilidad es mayor. Estas son: 7-OH en flavonas, isoflavonas y flavanonas; 3- (y 7-) OH en flavonoles y dihidroflavonoles; y 3- (y 5-) OH en antocianidinas.

El azúcar más frecuente es la glucosa, aunque también son comunes galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa. Otros azúcares que pueden aparecer ocasionalmente, son alosa, manosa, fructosa, apiosa y los ácidos glucurónico y galacturónico.

A menudo, se encuentran también disacáridos unidos al aglicón. Entre ellos, se destacan: soforosa (2-O- $\beta$ -D-glucosil-D-glucosa), gentiobiosa (6-O- $\beta$ -D-glucosil-D-glucosa), rutinosa (6-O- $\alpha$ -L-ramnosil-D-glucosa) y neohesperidosa (2-O- $\alpha$ -L-ramnosil-D-glucosa). En algunos casos, se han detectado tri- y tetrasacáridos.

El azúcar puede estar acilado, con ácidos como el acético o el ferúlico.

Entre las recopilaciones bibliográficas sobre flavonoides O-glicosilados, encontrados en la naturaleza, cabe destacar la de HARBORNE (1975) y sus actualizaciones (HARBORNE y WILLIAMS, 1982; HARBORNE y WILLIAMS, 1988).

### III.C. Flavonoides C-glicósidos

En estos compuestos, el azúcar se encuentra



directamente unido al anillo bencénico por un enlace C-C, resistente a los ácidos. Sólo se han encontrado C-glicósidos con el azúcar unido a las posiciones 6- y 8- del flavonoide.

La variedad de azúcares implicados es mucho menor que en el caso de los O-glicósidos, siendo la glucosa el más común (vitexina, orientina) y, más raramente, galactosa (apigenín-8-C-galactósido), ramnosa (violantina), xilosa (vicenin-1) y arabinosa (schaftósido).

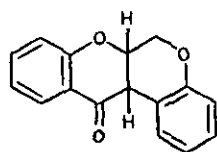
Aunque es posible encontrar C-glicósidos de isoflavona, flavanona y flavonol, son mucho menos frecuentes que los C-glicósidos de flavona.

Como en el caso de los O-glicósidos, pueden aparecer derivados de los C-glicósidos, por acilación (en el azúcar) u O-glicosilación (en el azúcar o en los hidroxilos fenólicos).

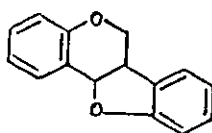
CHOPIN *et al.* (1982) han realizado una completa revisión bibliográfica sobre los flavonoides C-glicósidos, encontrados en la naturaleza.

#### IV. OTRAS ESTRUCTURAS FLAVONOIDICAS

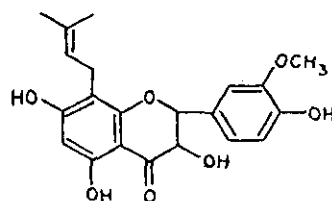
Además de las estructuras antes descritas, existen otros compuestos polifenólicos relacionados o derivados de los flavonoides. Entre ellos, se pueden destacar:



Rotenoides



Pterocarpanos



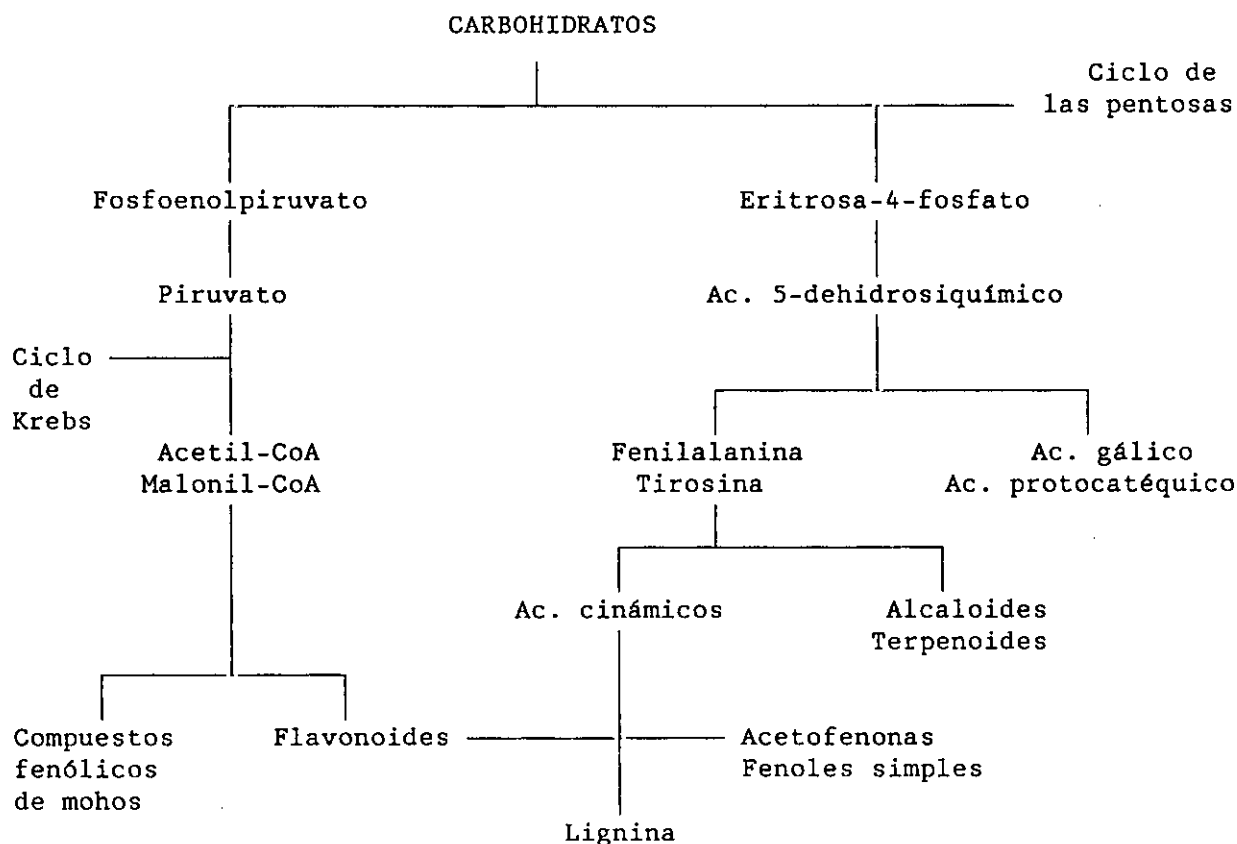
Flavonoides  
prenilados  
(8-C-prenilisoramnetina)

## 2.3. BIOSINTESIS

El conocimiento de las rutas biosintéticas de los compuestos fenólicos, en vegetales, ha experimentado un gran avance, gracias, por un lado, al desarrollo de la enzimología, mediante el estudio *in vitro* de reacciones bioquímicas elementales, utilizando sistemas enzimáticos aislados del material vegetal, y por otro, a la utilización de moléculas marcadas con  $^{14}\text{C}$ , y de mutantes caracterizados por haber perdido la capacidad de sintetizar determinadas moléculas.

### 2.3.1. Rutas generales de compuestos fenólicos

Tanto RIBEREAU-GAYON (1968), como HARBORNE (1975), han demostrado que la biosíntesis de compuestos aromáticos de las plantas tiene lugar a partir de los hidratos de carbono, según el esquema general que se indica a continuación.

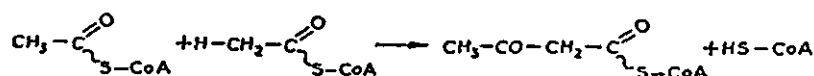


En la biosíntesis de los fenoles, los precursores principales son los ácidos acético y siquímico, por lo que existen dos vías metabólicas diferentes.

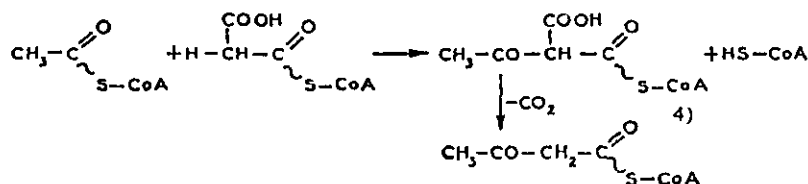
a) Vía del ácido acético

Este proceso implica la formación del anillo aromático, por condensación "cabeza-cola" de tres unidades de acetato (GRISEBACH, 1957).

La condensación de las unidades de acetato es una acilación, que parte de acetatos activados en forma de acetil-CoA. La presencia de la coenzima A aumenta la movilidad de los H del grupo metilo, facilitando la acilación.



En este proceso, la acetil-CoA puede experimentar una carboxilación que la transforma en malonil-CoA, por acción de la acetil-CoA carboxilasa, que requiere la presencia de ATP y  $Mg^{2+}$ . La movilidad del H del metileno, situado entre los dos grupos CO de la malonil-CoA, es mayor que la del metilo de la acetil-CoA. Por ello, la reacción de acilación, a partir de malonil-CoA, se desarrolla más fácilmente, obteniéndose, por descarboxilación, el mismo producto final de la reacción anterior. Este puede condensarse con otra molécula de malonil-CoA o de acetil-CoA.



Esta misma condensación ocurre en la primera fase de la

biosíntesis de ácidos grasos (LOWESTEIN, 1981).

En el esquema siguiente (figura I.4), se muestra la biosíntesis de compuestos fenólicos y ácidos grasos, a partir de la condensación por acilación de un ácido ( $R\text{-COOH}$ ) con tres moléculas de ácido acético.

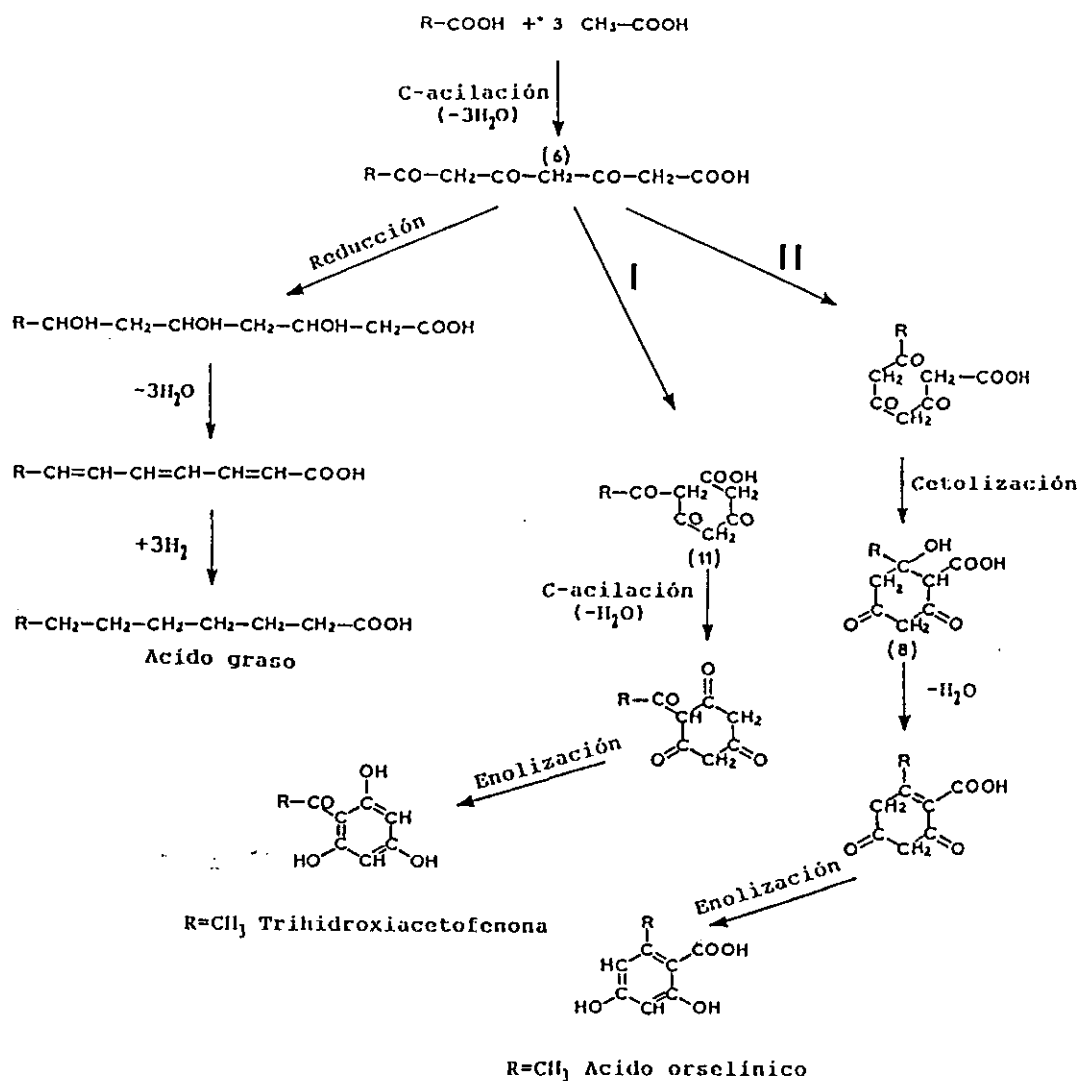


Figura I.4: Biosíntesis de compuestos fenólicos por la vía del ácido acético.

En la ruta I, el producto de condensación experimenta un proceso de C-acilación, dando lugar a un derivado cíclico, el cual, por enolización, genera un compuesto aromático. En la ruta II, la ciclación se produce mediante una reacción de cetolización, es decir, por condensación de un CO de una cetona con un C en  $\alpha$  respecto a otra cetona, con formación de una cetona etilénica, que posteriormente experimente un proceso de enolización, para dar lugar a un compuesto aromático.

#### b) Vía del ácido siquímico

La figura I.5 muestra el esquema de la vía del ácido siquímico.

Entre las enzimas más importantes que intervienen en las fases del proceso numeradas en el esquema (figura I.5), cabe destacar:

Fase 1. DAHP sintetasa, que cataliza la condensación de eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpirúvico. Tiene un pH óptimo, próximo a la neutralidad, y no requiere cofactores.

Fase 2. En la formación del ácido 5-dehidroquínico, se requieren  $\text{DPN}^+$  y  $\text{Co}^{2+}$ .

Fase 3. 5-dehidrogenasa, que cataliza la deshidratación del ácido 5-dehidroquínico a 5-dehidrosiquímico.

Fase 4. 5-dehidrosiquímico acidorreductasa, que cataliza el paso del ácido 5-dehidrosiquímico a ácido siquímico.

Fase 5. Quinasa, que controla la reacción de conversión del ácido siquímico a ácido prefénico.

Fase 6. Prefénico aromatasas, que cataliza, en medio ácido, la descarboxilación y la deshidratación del ácido prefénico, para formar el ácido fenilpirúvico.

Fase 7. Prefénico deshidrogenasa, que cataliza la conversión del ácido prefénico a ácido *p*-hidroxifenilpirúvico.

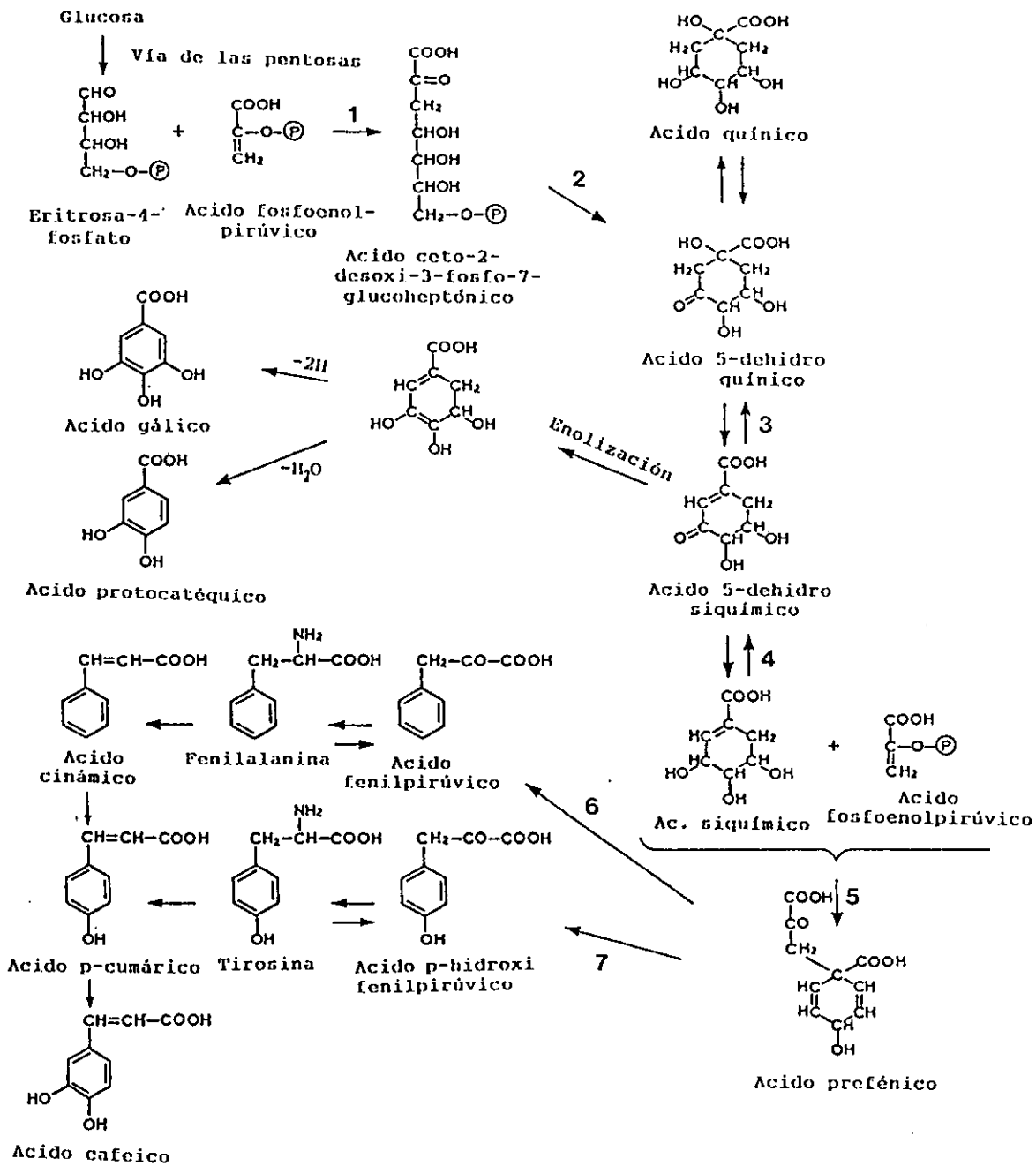


Figura I.5: Biosíntesis de compuestos fenólicos por la vía del ácido siquímico.

Esta vía representa la forma principal de acumulación de fenoles en plantas, además de ser el origen de los aminoácidos aromáticos. También explica la formación de ácidos benzoicos (ácido gálico y protocatéquico), por aromatización directa del ácido dehidrosiquímico (GROSS, 1981; DEWICK, 1983) y de ácidos cinámicos. Es posible, sin embargo, que los ácidos benzoicos y otros compuestos  $C_6$ ,  $C_6-C_1$  y  $C_6-C_2$  se formen a partir de los precursores  $C_6-C_3$  (ácidos cinámicos), por degradación de sus cadenas laterales  $C_3$  (EL-BASYOUNI *et al.*, 1964; BARZ y WELTRING, 1985).

La formación de aldehídos y alcoholes fenólicos, parte del ácido correspondiente, que se reduce, en primer lugar, para originar el aldehído y, posteriormente, el alcohol. Uno de los ejemplos más claros es la reducción de los ácidos cinámicos, para originar el alcohol coniferílico, precursor importante de las ligninas.

Los compuestos  $C_6-C_2$  se obtienen por descarboxilación oxidativa de los correspondientes  $\alpha$ -cetoácidos, generados a partir de fenilalanina y de tirosina.

Entre las revisiones bibliográficas sobre el metabolismo de fenoles simples y ácidos fenólicos, en plantas y en cultivos celulares vegetales, se pueden destacar las de GROSS (1985) y HASLAM y LILEY (1985).

### 2.3.2. Biosíntesis de flavonoides

En la figura I.6, se muestran el origen de 4-cumaril-CoA y malonil-CoA, precursores directos de los flavonoides, y las interrelaciones biosintéticas entre las diversas clases de flavonoides, en particular, los que presentan un solo hidroxilo en el anillo B. A continuación, la tabla I.1 engloba las enzimas implicadas en las distintas fases de estas rutas biosintéticas (HELLER y FORKMANN, 1988).

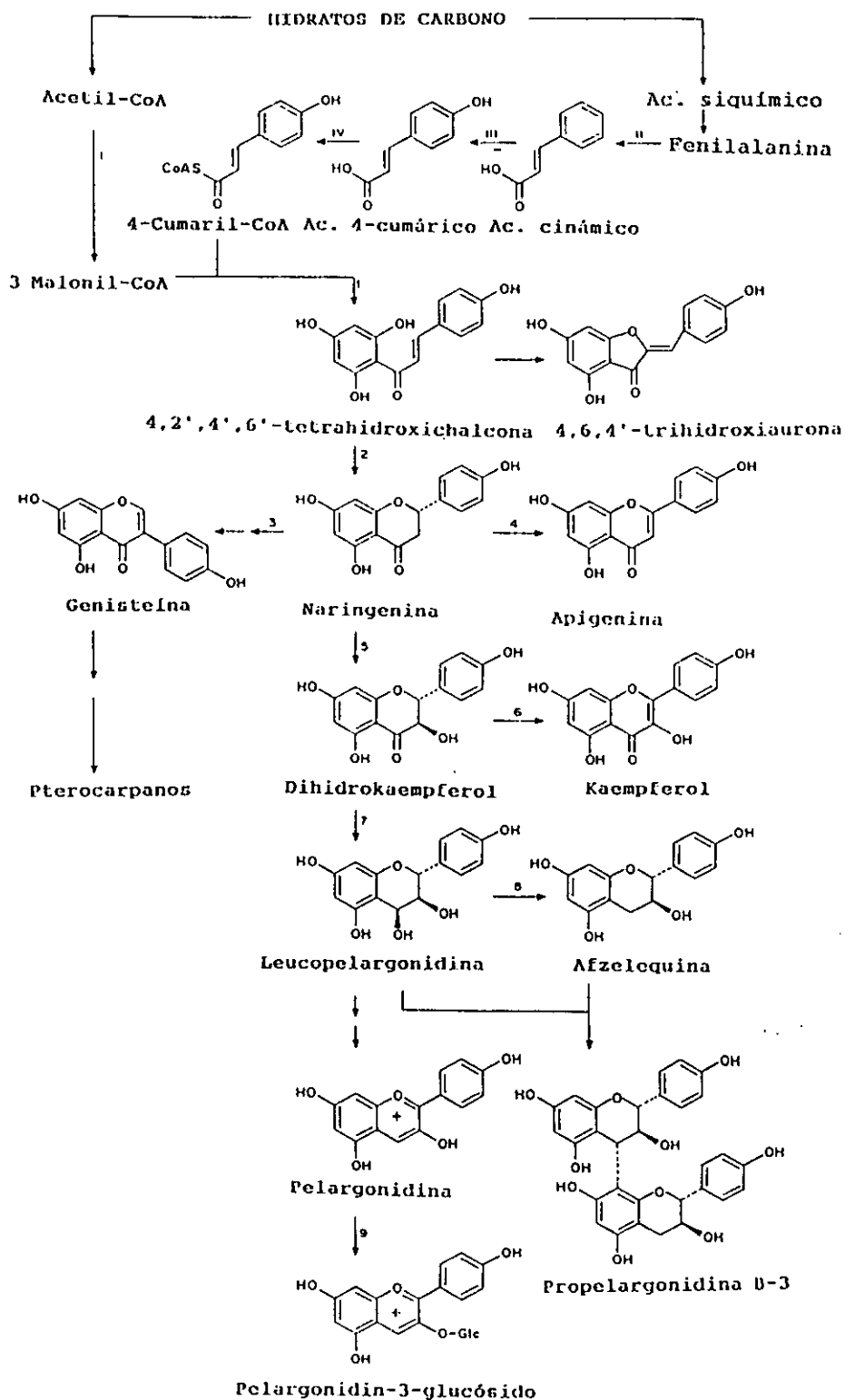


Figura I.6: Biosíntesis de flavonoides.



---

Tabla I.1: Enzimas que intervienen en la biosíntesis de los flavonoides

---

**Precusores**

- I. Acetil-CoA carboxilasa
- II. Fenilalanina amonioliase
- III. Cinámico 4-hidroxilasa
- IV. 4-cumarato-CoA ligasa

**Flavonoides**

- 1. Chalcona sintetasa
  - 2. Chalcona isomerasa
  - 3. 2-hidroxiisoflavanona sintetasa
  - 4. Flavona sintetasa
  - 5. (2S)-Flavanona 3-hidroxilasa
  - 6. Flavonol sintetasa
  - 7. Dihidroflavonol-4-reductasa
  - 8. Flavan-3,4-*cis*-diol-4-reductasa
  - 9. Antocianidin/flavonol 3-O-glucosiltransferasa.
- 

Los dos precursores derivan de azúcares. Como ya se indicó anteriormente, la malonil-CoA se sintetiza por carboxilación de acetil-CoA, siendo esta reacción catalizada por la acetil-CoA carboxilasa. En cuanto a la síntesis de la 4-cumaril-CoA, se inicia a partir de fenilalanina. La transformación de fenilalanina en ácido *trans*-cinámico, catalizada por la fenilalanina-amonioliase, constituye el puente entre el metabolismo primario y la síntesis de los compuestos de tipo fenilpropanoide.

La hidroxilación aromática del ácido cinámico, catalizada por la cinámico-4-hidroxilasa, origina el ácido 4-cumárico que se transforma en 4-cumaril-CoA, por acción de la 4-cumarato-CoA ligasa.

La fase principal de la biosíntesis de los flavonoides es la condensación de tres moléculas de malonil-CoA con la acil-CoA de un ácido hidroxicinámico, habitualmente el cumaril-CoA, para originar la correspondiente chalcona. Esta reacción está catalizada por la chalcona sintetasa. Flavonoides, auronas y difenilpropanoides derivan de esta chalcona intermediaria. La transformación, por la acción estereoespecífica de la chalcona isomerasa, da lugar a la (2S)-flavanona (naringenina).

Una reorganización oxidativa de la flavanona, que incluye un desplazamiento arílico de C<sub>2</sub> a C<sub>3</sub>, catalizada por la isoflavona sintetasa, origina una isoflavona (genisteína).

La introducción de un doble enlace entre C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> de una flavanona origina la serie de las flavonas. Se conocen dos enzimas diferentes que catalizan esta reacción: una dioxigenasa y una mono-oxigenasa de función mixta.

Los dihidroflavonoles se forman por hidroxilación directa en posición C<sub>3</sub> de flavanonas. Esta reacción está catalizada por la flavanona-3-hidroxilasa, una dioxigenasa.

Los dihidroflavonoles son intermediarios biosintéticos en la formación de flavonoles, catequinas, proantocianidinas y antocianidinas:

- Los flavonoles se obtienen por introducción de un doble enlace entre C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> de dihidroflavonoles, reacción catalizada por la flavonol sintetasa (también dioxigenasa).

- La reducción del grupo carbonilo en C<sub>4</sub> de los dihidroflavonoles da lugar a los flavan-2,3-*trans*-3,4-*cis*-dioles o leucoantocianidinas, precursoras de catequinas y proantocianidinas. Las primeras se sintetizan a partir de leucoantocianidinas, por acción de la flavan-3,4-*cis*-diol-reductasa. Las proantocianidinas se obtienen por condensación de catequinas y leucoantocianidinas. El paso de

leucoantocianidinas a antocianidinas está poco esclarecido. La obtención de antocianinas implica una glicosilación en C<sub>3</sub> de antocianidinas.

La diversidad de flavonoides, encontrados en la naturaleza, surge mediante modificaciones por hidroxilación de los anillos A y B, por metilación de los hidroxilos y por glicosilación y acilación. Se han descrito numerosas enzimas catalizadoras de estos procesos. Algunas de ellas pueden actuar sobre los productos intermediarios (flavanona y dihidroflavonol) o sobre los productos finales (flavona, isoflavona, flavonol o antocianina), mientras que otras sólo sobre los finales.

A continuación, se describen las características de las enzimas más importantes que intervienen en el proceso:

1. Chalcona sintetasa. La formación de chalcona está catalizada por la chalcona sintetasa (EBEL y HAHLBROCK, 1982). Puesto que la chalcona es la estructura C<sub>15</sub> intermediaria básica para todo tipo de flavonoides, se considera esta enzima como clave en la biosíntesis de flavonoides. No requiere cofactores. Los sustratos son malonil-CoA y acil-CoA de ácidos hidroxicinámicos. En muchos casos, presenta inhibición por la flavanona que se pueda formar en la reacción.

2. Chalcona isomerasa. Con sólo unas pocas excepciones, las diferentes clases de flavonoides (flavonas, flavonoles, antocianinas e isoflavonas) derivan de una flavanona intermediaria. Las flavanonas se forman a partir de chalconas por isomerización. En el caso de un patrón de hidroxilación 2',4',6'-trihidroxilado (tipo floroglucinol), esta reacción se produce espontáneamente en condiciones fisiológicas, originando un producto racémico.

Sin embargo, parece que sólo flavanonas, con configuración (2S), son sustratos para las enzimas de las

rutas flavonoídicas. Por ello, existen chalcona-isomerasas que catalizan la formación estereoespecífica de (2S)-flavanonas, a partir de los respectivos sustratos de chalcona.

Se conocen dos tipos de chalcona isomerasa, según la especificidad del sustrato. En plantas que contienen 5-desoxi y 5-hidroxi flavonoides, la enzima es capaz de isomerizar tanto chalconas 2',4'-dihidroxi- (tipo resorcinol) como 2',4',6'-trihidroxi (tipo floroglucinol). En plantas que carecen de 5-desoxiflavonoides, la enzima es específica para chalconas tipo florogucinol.

3. Formación de isoflavona. Se ha encontrado que están implicados dos procesos enzimáticos en la transformación de una flavona en isoflavona. El primero abarca la oxidación y reorganización de flavanona a 2-hidroxi-2,3-dihidroisoflavona. Este paso es estrictamente dependiente de NADPH y de  $O_2$ . Su inhibición por citocromo c y/o por CO, y su reversibilidad por acción de la luz, así como su inhibición por inhibidores de citocromo P-450, indican la participación de un sistema enzimático dependiente del citocromo P-450 (KOCHS y GRISEBACH, 1986).

El segundo sistema enzimático que cataliza la eliminación de  $H_2O$  de la 2-hidroxi-isoflavona no se ha descubierto todavía.

4. Formación de flavona. Se han aislado sistemas enzimáticos de distintas procedencias, que catalizan la conversión de flavanonas a flavonas, y cuyos requerimientos de cofactores son bien distintos, desde  $Fe^{2+}$ , 2-oxoglutarato y ascórbico (BRITSCH *et al.*, 1981), hasta NADPH (STOZT y FORKMANN, 1982). El mecanismo de formación del doble enlace no está claro; se sospecha que se forma una 2-hidroxi flavanona en un primer paso, y que, a continuación, una deshidratasa facilita la eliminación de una molécula de  $H_2O$ .

5. Flavanona-3-hidroxilasa. Se ha localizado en la fracción soluble. Requiere, como cofactores, 2-oxoglutarato,  $\text{Fe}^{2+}$  y, para completar su actividad, ascorbato. Está clasificada como una dioxigenasa dependiente de oxoglutarato (ABBOTT y UDENFRIEN, 1974).

6. Formación de flavonol. La síntesis de flavonoles está catalizada, como en el caso anterior, por una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato (BRISTSCH *et al.*, 1981). La reacción transcurre a través de un intermediario 2-hidroxi, con deshidratación posterior. Estos intermediarios (por ejemplo, 2-hidroxidihidrokaempferol o 2-hidroxidihidroquercetina) pueden eliminar espontáneamente una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ , para originar los respectivos flavonoles.

7. Dihidroflavonol-4-reductasa. STAFFORD y LESTER (1982) confirmaron la existencia de una dihidroflavonol-4-reductasa dependiente de NADPH, implicada en la síntesis de leucoantocianidina. Esta fue obtenida a partir de preparaciones enzimáticas, extraídas de cultivos celulares de *Pseudotsuga menziessi*. No obstante, se han encontrado reductasas de otras procedencias, capaces de mostrar actividades superiores a un 90 % con NADH, como cofactor, (KRISTIANSEN, 1986).

8. Formación de catequinas y proantocianidinas. Han sido aisladas reductasas, capaces de transformar *cis*-leucocianidina y *cis*-leucodelphinidina en las correspondientes flavan-2,3-*trans*-3-oles, catequina y galocatequina. La reacción es dependiente de NADPH. No obstante, todavía no ha sido detectada la enzima condensante que debe intervenir en la síntesis de proantocianidinas oligoméricas (KRISTIANSEN, 1986).

9. Formación de antocianidín-3-O-glucósido. Al contrario que los aglicones de flavona y flavonol, las antocianidinas rara

vez aparecen, como tales, en la naturaleza. Los primeros productos estables en la biosíntesis de antocianinas son los antocianidín-3-glicósidos, con glucosa como sustituyente más frecuente. Por eso, las enzimas que catalizan la 3-O-glicosilación no se consideran enzimas de modificación, sino enzimas implicadas directamente en la formación de antocianinas.

A excepción de la UDP-glucosa-flavonoide-3-O-glucosil-transferasa, ampliamente estudiada, el resto de enzimas que catalizan la conversión de leucoantocianidinas en antocianinas son desconocidas. Esencialmente, deben existir cuatro pasos en la reacción: una hidroxilación en C<sub>2</sub>, dos deshidrataciones y una glicosilación del hidroxilo en C<sub>3</sub>. Estos pasos pueden ordenarse en distintas secuencias, pero parece claro que la glicosilación debe ser uno de los pasos finales, ya que no se han encontrado leucoantocianidinas y dihidroflavonoles glicosilados en C<sub>3</sub>.

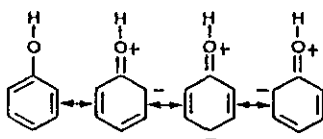
#### 2.4. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

Al analizar las propiedades fisicoquímicas de los compuestos fenólicos, es necesario considerar, por un lado, las propiedades debidas a los grupos OH, modificadas por la presencia del ciclo bencénico, y, por otro, las debidas a este ciclo, en relación con la presencia de grupos hidroxilo o de otros sustituyentes.

El anillo bencénico, caracterizado por el fenómeno de la mesomería, es una estructura particularmente estable. Es poco probable que el anillo se rompa en una reacción química o biológica. Las reacciones de adición son mucho más difíciles que sobre dobles enlaces de hidrocarburos etilénicos. Las reacciones más frecuentes son las de sustitución (de un H por otro grupo).

## 1. Carácter ácido

En el fenol, la interacción entre el grupo OH y el anillo bencénico se traduce en una gran movilidad electrónica, que da lugar a una serie de fórmulas límite, correspondientes a las distintas localizaciones de los  $e^-$ .



Estas fórmulas están caracterizadas por una baja densidad electrónica sobre el átomo de O, que determina que el propio O atraiga los  $e^-$  del enlace que le une al H dentro del grupo OH. Esto facilita la ruptura del enlace O-H, y dificulta la ruptura del enlace C-O.

Esta facilidad de ruptura entre el O y el H confiere al H del fenol su carácter ácido: los fenoles en solución alcalina se encuentran en forma de "fenolatos", con propiedades espectrales completamente distintas a las del fenol correspondiente.

En ciertos casos, el carácter ácido de ciertos compuestos fenólicos se utiliza para su extracción selectiva con soluciones alcalinas.

## 2. Formación de puentes de Hidrógeno

Como los alcoholes, los fenoles experimentan asociaciones intra o intermoleculares mediante enlaces por puente de H. Estos puentes de H modifican gran número de propiedades físicas como los puntos de fusión y ebullición (que aumentan como consecuencia de estos enlaces), la solubilidad (que disminuye en medio alcalino) y los espectros infrarrojo y ultravioleta.

La existencia de puentes de H disminuye, en general, la

reactividad de los grupos fenólicos, en relación con su aptitud para formar éteres o ésteres.

### 3. Formación de complejos con los metales

La formación, por quelación, de complejos de compuestos fenólicos con metales (principalmente Fe y Al) es muy utilizada para la cuantificación de estas sustancias, para su identificación, mediante la modificación que experimenta su espectro UV al complejarse, y para el revelado de los cromatogramas.

Pero la formación de complejos con iones metálicos no sólo es importante para fines analíticos, sino que también lo es desde el punto de vista fisiológico (JURD y GEISMANN, 1956). Así, las tonalidades azuladas de algunas plantas son producidas por antocianidinas púrpuras que, *in vivo*, cambian de color al formar complejos (ver apartado II.2.5.2.). Se conocen quelatos azules de cianidina y delfinidina con Mg, Al y Fe.

### 4. Formación de ésteres y de éteres

Los fenoles reaccionan fácilmente con ácidos orgánicos, aunque, contrariamente a lo que sucede con los alcoholes, no son esterificados por ácidos inorgánicos. Sin embargo, en la naturaleza existen pocos ésteres de fenoles. Cabría destacar los ésteres de azúcares con los ácidos gálico y elágico y los ésteres de antocianinas con ácidos orgánicos, como el ácido cinámico.

Por el contrario, la formación de éteres es muy frecuente en la naturaleza y, particularmente, la formación de éteres mixtos entre una función fenol y el alcohol metílico. El grupo metoxilo resultante ( $-\text{OCH}_3$ ) es muy corriente, sobre todo, en el caso de antocianinas y ácidos fenólicos; además, es particularmente estable química y biológicamente.

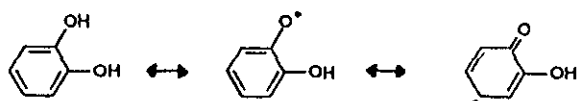
Las reacciones de eterificación son muy utilizadas en la



identificación estructural de flavonoides, ya que, por un lado, los grupos éter son más estables que los enlaces heterosídicos, y, por otro, confieren un aumento de volatilidad a la molécula de flavonoide, lo que facilita su estudio por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

## 5. Oxidación

Al trabajar con compuestos fenólicos, en general, debe evitarse el contacto con sustancias o agentes oxidantes, capaces de provocar la formación de radicales libres, ya que estos son muy inestables, y pueden reaccionar rápidamente polimerizándose, dando lugar a productos de color marrón. En este sentido, son especialmente sensibles los compuestos o-dihidroxifenólicos.



La síntesis de polímeros vegetales, como la lignina, podría estar relacionada con la formación de radicales libres de este tipo.

Este fenómeno explicaría también el oscurecimiento de productos alimentarios de origen vegetal.

La facilidad de oxidación de ciertos compuestos fenólicos permite utilizarlos como antioxidantes. Esta propiedad se desarrolla con más detalle dentro del apartado II.2.8.2., de Aplicaciones en la industria alimentaria.

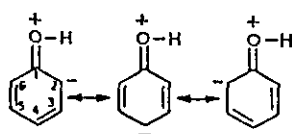
Desde el punto de vista analítico, ciertos agentes oxidantes se utilizan para la valoración de compuestos fenólicos, así como para el revelado de cromatogramas en capa fina o papel. Se pueden citar el nitrato de plata amoniacal, el reactivo de Folin-Ciocalteu y el permanganato potásico (RIBEREAU-GAYON, 1968).

## 6. Sustitución electrófila sobre el anillo bencénico

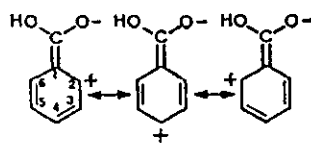
Como se ha indicado con anterioridad, el anillo bencénico, de estructura muy estable, experimenta con más facilidad reacciones de sustitución que de adición.

La influencia que ejercen sobre la sustitución los distintos grupos químicos, unidos al anillo, varía de unos a otros. A continuación, se describe el efecto de los grupos OH y CO, los más frecuentes implicados en la estructura de ácidos fenólicos y flavonoides.

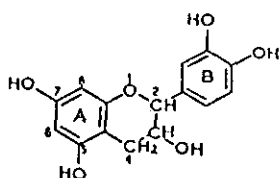
El grupo OH actúa como dador de  $e^-$ , por lo que aumenta la densidad electrónica del anillo bencénico en posiciones 2, 4, 6, y activa la sustitución en dichas posiciones.



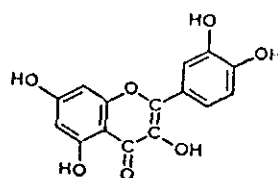
El grupo CO ejerce un efecto opuesto: es aceptor de  $e^-$ , por lo que desactiva el anillo, disminuye la densidad electrónica en orto y para, y orienta la sustitución en meta.



Esto explica, por ejemplo, la diferente reactividad de flavanos y flavonas o flavonoles. El anillo A de flavanos (catequina) es más sensible a sustitución que el anillo A de flavonol (quercetina), desactivado por el grupo CO.



Catequina



Quercetina

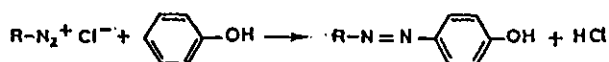
En consecuencia, la vainillina reacciona con la catequina y no lo hace con la quercetina.

Este tipo de reacciones de sustitución, probablemente, intervenga en las rutas metabólicas de formación de taninos condensados, a partir de flavanos.

Como ejemplos de reacciones de sustitución, con interés para la valoración cuantitativa o la detección de los compuestos fenólicos tratados, se destacan:

a) Reacciones de copulación con sales de diazonio.

Los compuestos fenólicos reaccionan con sales de diazonio, dando reacciones de sustitución sobre el anillo bencénico y originando colorantes azoicos, cuyo color varía en función de la estructura del fenol.

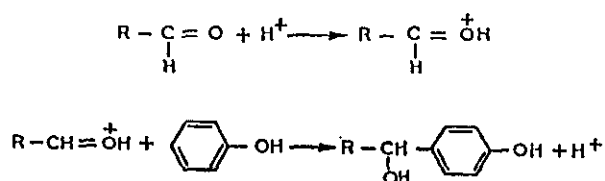


Este tipo de reacciones se emplea para la detección sobre cromatogramas en papel o capa fina. Se suelen utilizar *p*-nitroanilina, ácido sulfanílico y bencidina diazotados. El color resultante depende del pH (RIBEREAU-GAYON, 1976).

b) Reacciones de condensación con aldehídos.

En presencia de ácidos fuertes, los compuestos carbonílicos, principalmente los aldehídos, pueden originar

un reactivo electrófilo capaz de reaccionar con los fenoles:

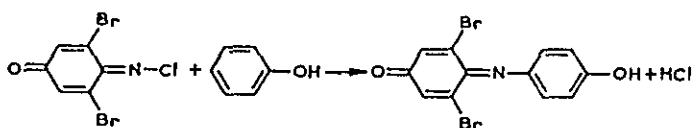


Hay dos aplicaciones de la reacción de condensación de fenoles con aldehídos de gran interés:

- Reacción con formaldehído, que conduce a la formación de resinas "fenol-formaldehído", y que se utiliza también para la eliminación de los compuestos fenólicos de un extracto vegetal por precipitación con este reactivo, en medio ácido.

- Reacción con vainillina, para el revelado de cromatogramas o para la valoración de compuestos fenólicos naturales.

c) Otra reacción de interés es la que experimentan los fenoles con la 2,6-dibromoquinona clorimina o reactivo de Gibbs que, en medio alcalino, conduce a la formación de 2,6-dibromoindofenol de color azul.



Este reactivo se utiliza, como revelador, en cromatografía en capa fina o papel.

## 2.5. FUNCIONES BIOLOGICAS

### 2.5.1. Defensa vegetal

Una de las posibles funciones biológicas, atribuidas a los compuestos fenólicos, es la de constituir parte del sistema de defensa vegetal frente a infecciones (GOODMAN *et al.*, 1986; SURICO *et al.*, 1987). Parecen intervenir en diferentes etapas de la estrategia defensiva de la planta; entre ellas, la muerte y necrosis de la célula huésped, la acumulación de toxinas, la modificación de las paredes celulares y la síntesis de antibióticos específicos (MATERN y KNEUSEL, 1988). La participación en cada etapa depende del patógeno y de la planta (NICHOLSON y HAMMERSCHMIDT, 1992). Muchos de ellos están incluidos dentro del grupo de las fitoalexinas, es decir, sustancias biocidas producidas por las plantas en respuesta al ataque de patógenos. De entre ellas, las más comúnmente descritas son los flavonoides.

Así, se reconocen sus actividades:

- Insecticida: La maisina, una C-glicosil-flavona, aislada del maíz, inhibe el crecimiento y desarrollo del gusano *Heliothis zea* (ELLIGER *et al.*, 1980).

- Fungicida: Se asocia esta actividad con un amplio grupo de compuestos. De hecho, existen estudios que relacionan estructura/actividad fungicida de flavonas, flavanonas y catequinas frente al género *Aspergillus* (WEIDENBÖRNER *et al.*, 1990). En otros casos, se estudia el comportamiento de diversos flavonoides, extraídos de madera de *Salix caprea* frente a una amplia variedad de hongos destructores de madera (MALTERUD *et al.*, 1985). Parece comprobado que todos los flavonoides ensayados muestran alguna actividad fungicida, aunque la mayor parte de ellos son activos sólo frente a uno de los hongos estudiados. Estas propiedades fungicidas, asociadas también a dihidroflavonoles y flavonoles, contribuyen a la durabilidad y protección de la

madera (HERGERT, 1962).

No obstante, la máxima capacidad fungicida se asocia siempre con el grupo de los isoflavonoides. Ya se ha considerado la posibilidad de utilizar estos compuestos como sustitutos de fungicidas convencionales. Por ello, se han analizado las relaciones estructura/actividad, así como los mecanismos de acción de las isoflavonas (WEIDENBÖRNER *et al.*, 1989; 1990b; LAKS y PRUNER, 1989). Se ha comprobado que el grado de reducción, la posición y número de hidroxilos (en particular la existencia de dos hidroxilos) y la presencia de una función oxigenada con sustituyentes distintos de grupos metiléter, son parámetros importantes para esta actividad. En cuanto al mecanismo de acción, se sospecha que la actividad de estos compuestos depende de la acidez de sus grupos hidroxilo, que puede provocar un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.

También se han realizado estudios sobre el poder fungicida de algunas chalconas que, aunque ellas mismas no presentan actividad, sí la poseen algunos productos de su degradación, como ciertas orto-diquinonas, derivadas de la floretina (POWELL y HILDEBRAND, 1970).

- Bactericida: Se ha comprobado, la actividad *in vitro* de una serie de flavonoides frente a diversas cepas bacterianas, tomando como testigos una serie de hongos sensibles a los compuestos analizados. De los flavonoides analizados, los que presentaron mayor actividad, fueron los flavonoles (EL-GAMMAL y MANSOUR, 1986). El poder bactericida se asocia también con el grupo de isoflavonoides (CASTRO *et al.*, 1986).

#### 2.5.2. Contribución al color en los vegetales

El color de las flores es producto de la absorción preferencial de parte de la luz visible por uno o varios

compuestos químicos sintetizados por las plantas superiores. Puesto que las plantas no pueden "ver" sus propios colores, parece evidente que los colores son mensajes interpretables por mamíferos, pájaros e insectos (HARBORNE, 1976), y suponen un enlace entre animales y plantas, lo mismo que sucede con el tamaño, olor o forma de las flores. En particular, insectos y pájaros, atraídos por el color, polinizan las flores y ayudan a la supervivencia de las especies vegetales. Al contrario que el hombre, algunos insectos, especialmente las abejas, pueden percibir tanto la radiación en el visible como en el UV cercano (340-380 nm).

Los pigmentos, responsables de la coloración de las flores, son esencialmente flavonoides, y están localizados en las vacuolas celulares (McCLURE, 1979). De ellos, las antocianinas proporcionan la mayor parte de los colores rosa, naranja, violeta, rojo y azul (HARBORNE, 1967). Las chalconas, auronas y flavonoles contribuyen al color amarillo. El resto de los flavonoides son incoloros para el hombre, aunque visibles para algunos insectos. Las flavonas, flavonoles y sus glicósidos tienen también importancia respecto al color de las flores, porque actúan como co-pigmentos.

Existe una importante revisión (HARBORNE, 1976) sobre la contribución de los flavonoides al color de las flores. De ella se deduce que, aunque el grupo de pigmentos más notable es el de las antocianinas, para explicar completamente el fenómeno de las coloraciones es necesario considerar las interacciones que existen, a nivel molecular, entre éstas y otros constituyentes vacuolares, como otros flavonoides, iones minerales, azúcares, péptidos y ácidos orgánicos.

### 2.5.3. Reguladores fisiológicos

La regulación fisiológica es una de las funciones menos conocidas de los compuestos fenólicos, aunque cabe pensar que debió de ser de las primeras en el proceso evolutivo, ya que su

lugar de acción está localizado en el citoplasma, cerca de la zona de formación de estos compuestos (STAFFORD, 1991).

Los efectos más complejos son los asociados con la hormona del crecimiento, el ácido indolacético (IAA). Los flavonoides con anillos B monohidroxilados actúan como cofactores de una peroxidasa que funciona como IAA oxidasa, destruyendo la hormona. Por el contrario, los flavonoides con anillos B dihidroxilados inhiben esa actividad degradante de IAA (GALSTON, 1969). Trabajos más recientes asocian ambas formas mono- y dihidroxiladas con la inhibición del transporte de IAA a través de la membrana plasmática, por anclaje a una proteína de dicha membrana (JACOBS y RUBERY, 1988).

#### 2.5.4. Filtros UV

No se sabe, con certeza, la extensión de la capa de ozono en la atmósfera de la tierra en el momento en que surgieron las plantas vasculares. Lo que parece evidente es que la ausencia total o parcial de ésta, permitiría el acceso de parte de la radiación UV que dañaría a las plantas al brotar. De ahí, la necesidad de disponer de unas sustancias que actuaran como filtros frente a la radiación UV. Esta fue, probablemente, la función primitiva de flavonoides y compuestos de tipo fenilpropanoide (KUBITZKI, 1987). Los coeficientes de absorción, tanto en valores molares como en peso, son menores en los compuestos de tipo fenilpropanoide que en los flavonoides (STAFFORD, 1991).

Mezclas de flavanonas, flavonas, dihidroflavonoles y flavonoles en las vacuolas de las células epidérmicas de las hojas sirven como filtros, reduciendo la radiación UV-B y UV-A que atraviesa la capa de ozono de la atmósfera de la tierra. Se ha demostrado que la capa de células epidérmicas en las que se acumulan los flavonoides, protegen a las capas inferiores de células mesofílicas, absorbiendo un 90 % de la radiación UV-B (ROBBERECHT y CALDWELL, 1978).



## 2.6. APLICACIONES FARMACOLOGICAS

### 2.6.1. Actividad antiinflamatoria

En 1936, RUSZNYAK y SZENT-GYORGI observaron que ciertos estados patológicos, caracterizados por un incremento de la permeabilidad o fragilidad de las paredes de los capilares, podían ser tratados con extractos de limón. Al factor que incrementa la resistencia capilar se le llamó vitamina P. Este término cayó en desuso cuando pasó a asociarse esta actividad con flavonoides. Se separó la mezcla de flavonoides de los cítricos en tres fracciones por su diferente solubilidad en metanol, acetato de etilo y agua. La mayor parte de la actividad antiinflamatoria se localizó en la fracción acuosa, en la que fueron identificadas hesperidina, naringina y nobiletina, junto a la 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona.

En esta línea de estudios, se observó que ciertos edemas cerebrales y hemorragias pleurales, en ratas, se reducen significativamente cuando éstas se trataban con derivados de rutina o hesperidina (BENKO *et al.*, 1970).

Actualmente, se encuentra comercializada la hidroxietilrutina (e.g., Venoruton), ampliamente utilizada para el tratamiento de hemorroides, retinopatía diabética, venas varicosas y otros problemas relacionados con fragilidad capilar.

En los últimos años, los estudios se han encaminado a demostrar que los flavonoides no sólo reducen la permeabilidad capilar, sino que también pueden inhibir distintos estadios en los procesos inflamatorios, desde la formación del tejido de granulación hasta la artritis crónica (GABOR, 1979). Así, se ha estudiado el efecto antiinflamatorio de la nepitrina, cuya actividad procede de su antagonismo a mediadores, como la bradiquinina y la angiotensina (AGARWAL, 1982).

La quercetina inhibe la secreción de histamina por

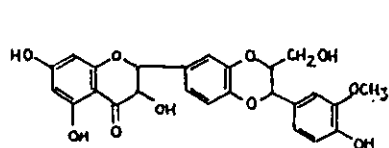
mastocitos (MIDDLETON y DRZEWIECKI, 1982); y funciones neutrófilas, como la liberación de enzimas lisosomales, el consumo de oxígeno, la formación de radicales libres y la quimiotaxis (BUSSE *et al.*, 1984).

Otros flavonoides que actúan como agentes antiinflamatorios, son: apigenín-7-galactósido, luteolín-7-galactósido, kaempferol y algunos de sus glicósidos (TUBARO *et al.*, 1989).

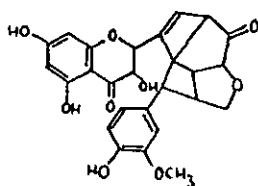
### 2.6.2. Actividad antihepatotóxica

Desde hace más de 2000 años, se vienen atribuyendo propiedades medicinales a los extractos solubles en agua de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (MABRY y ULUBELEN, 1980). El compuesto activo es la silimarina, una mezcla de tres isómeros (silibina, silidianina y silicristina), resultantes de la condensación de una molécula de taxifolina y otra de alcohol coniferílico. La silimarina es una de las pocas drogas, no inmunosupresoras, que se aplican al tratamiento de hepatopatías toxicometabólicas, cirrosis hepática y hepatitis vírica aguda (VOGEL, 1977). Tiene acción anticitolítica, ya que disminuye la peroxidación lipídica en las membranas pericelulares e intracelulares (microsomas y mitocondrias). Asimismo, estimula la síntesis proteica a través de un aumento de la actividad de la polimerasa A, activando, en consecuencia, los procesos anabólicos y enzimáticos intracelulares.

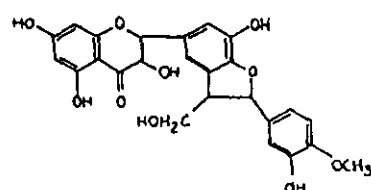
#### Silimarina



Silibina



Silidianina



Silicristina

También han sido estudiados, en profundidad, los aspectos bioquímicos, farmacológicos y clínicos de la (+)-catequina (Proceedings of the International Symposium of New Trends in the Therapy of Liver Disease, 1974) en el tratamiento de las enfermedades hepáticas.

### 2.6.3. Efectos en el sistema vascular

Son muchos y muy variados los efectos sobre el sistema vascular central, descritos para diversos polifenoles:

- Efectos antiateromatosos, consecuencia de la reducción del colesterol, triglicéridos y  $\beta$ -lipoproteínas del suero, producidos por quercetina, luteolina, hispidulina y otros glicósidos (ANDREEVA *et al.*, 1987).
- Inhibición de la agregación plaquetaria, reconocido efecto de la quercetina, rutina, 3-metil-quercetina, fisetina, dihidroquercetina y flavona (LACKEMAN *et al.*, 1986).
- Actividad espasmolítica. La 5,8-dimetoxi-2-metil-furano-cromona muestra efectos antiespasmódico y vasodilatador coronario, probablemente, por inhibición del flujo de calcio (UBEDA y VILLAR, 1989).
- Inhibición de los sistemas lipooxigenasa y ciclooxigenasa, demostrada para la quercetina y rutina (TAKAHAMA, 1985).

### 2.6.4. Actividad antitumoral

Al estudiar la actividad de una serie de flavonoides, SCHWARTZ y MIDDLETON (1984) demostraron que la quercetina inhibía, *in vitro*, la generación y la acción de linfocitos T citotóxicos. Las relaciones estructura-actividad revelaron que la presencia de un doble enlace en posición C<sub>2-3</sub>, la de un grupo ceto en C<sub>4</sub>, la de un grupo hidroxilo libre en C<sub>3</sub> y/o la hidroxilación en el anillo B, son determinantes de dicha actividad.

En otros estudios en los que se analizaba la actividad, frente a células HeLa *in vitro*, de las flavonas y flavanonas con sustituyentes hidroxilo y metoxilo, fue la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona la que presentó mayor actividad (CHIKAO *et al.*, 1986). También se ha demostrado la actividad citotóxica de algunos flavonoides frente a células KB (LIN *et al.*, 1989), P-388, He La S3 o HEP-2 (PATHAK *et al.*, 1991).

Aunque existen estudios que demuestran la actividad, *in vivo*, de algunos flavonoides frente a varios carcinomas, como la quercetagetina y la patuletina frente al carcinoma Lewis de pulmón (ICKES *et al.*, 1973), no se ha establecido el uso de flavonoides en el tratamiento de cánceres.

Por otra parte, el ácido elágico es un potente inhibidor de la mutagenicidad y citotoxicidad del benzo( $\alpha$ )-pireno (BECKER *et al.*, 1985).

Algunos ácidos fenólicos se utilizan como marcadores tumorales, por ejemplo, ciertos derivados del ácido vainílico, que facilitan el diagnóstico diferencial de neuroblastoma, feocromocitoma y tumores relacionados (BINDER y SIVORINOVSKY, 1984).

#### 2.6.5. Actividad antimicrobiana y antiviral.

NISHINO *et al.* (1987) estudiaron la actividad de la epigallocatequina y otros 26 flavonoides afines, frente a *Staphylococcus epidermis* (Gram-positivo), *Proteus vulgaris* (Gram-negativo) y *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo). Encontraron que la presencia de hidroxilos y la planaridad de la molécula eran requisitos necesarios para la actividad bactericida. Además, se demostró que, en el caso de *P. vulgaris*, los flavonoides activos inhiben la síntesis de DNA, mientras en el de *S. aureus*, resultó inhibida la síntesis de RNA.

Fuerte actividad fungicida presentan flavonoles como la

quercetina y sus glicósidos rutina e isoquercitrina y el kaempferol (BESCHIA *et al.*, 1982), flavonas como la apigenina y derivados (SINGH *et al.*, 1988) e isoflavonas (STOESSEL, 1985).

En cuanto a la actividad antiviral, quercetina, quercitrina, morina, apigenina y luteolina inhiben, *in vitro*, la multiplicación del virus *Auzesky* (BELADI *et al.*, 1981). Quercetina, dihidroquercetina y procianidina actúan como virustáticos frente al virus del *Herpes simple* tipo I, al de la polio y al de la fiebre Mengo (MUSCI, 1985).

Existen otros estudios comparativos de actividad de distintos flavonoides frente a *Rhinovirus* que revelan que la presencia de grupos 3-metoxi y 5-hidroxí es determinante de la actividad de estos compuestos (TSUCHIYA *et al.*, 1985).

#### 2.6.6. Actividades diversas

Existe otra serie de aplicaciones farmacológicas, descritas en casos puntuales, de las que se exponen algunos ejemplos a continuación:

- Actividad antialérgica, descrita para quercetín-3,3'-dimetiléter, quercetín-3-metiléter, apigenina (YUTAKA y USHIO, 1985); quercetina y tangeretina (MOOKERJEE *et al.*, 1986); kaempferol y naringenina (WELTON *et al.*, 1986).
- Actividad antidiarreica, asociada a galangina, miricetina, kaempferol y quercetina (LAU-CAM y CHAN, 1973).
- Actividad antiulceroso, estudiada en relación con la inhibición de la catecol-O-metiltransferasa en ratones con úlceras, inducidas por stress de frío (BARNAULOV *et al.*, 1984).
- Actividad analgésica, encontrada en crisina, morina y rutina (SAMBANATHAN *et al.*, 1985). Entre los compuestos

fenólicos de bajo peso molecular, el caso más evidente es el del ácido salicílico, precursor del ácido acetilsalicílico (aspirina) y derivados. Este compuesto presenta también actividades antiinflamatorias y antipiréticas.

- Actividad espasmolítica: la 7, 4'-dihidroxi-flavanona y su chalcona correspondiente presentan actividad espasmolítica semejante a la de la papaverina (SRINIVASAN *et al.*, 1971).

- Actividad antimalárica. Se ha encontrado que la quercetina, *in vitro*, posee actividad antimalárica frente a *Plasmodium falciparum* (KHALID *et al.*, 1986).

- Actividad estrogénica, encontrada en isoflavonas estructuralmente semejantes a estilbestroles que poseen actividad estrogénica parecida (FARNSWORTH *et al.*, 1975).

- Actividad hipoglucemiante, analizada en ratas diabéticas que fueron tratadas con quercetina y quercitrina (NAGAWA y SAHAR, 1988).

- Actividad inhibidora de enzimas. Se ha reconocido que ciertos flavonoides son capaces de inhibir diversas enzimas, como la aldosa reductasa (OKUDA *et al.*, 1984), la xantina oxidasa (NORO *et al.*, 1983), la fosfodiesterasa (NIKAIDO *et al.*, 1988), la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (FEWTRELL y GOMPERTS, 1977), la lipooxigenasa (YOSHIMOTO *et al.*, 1983), la ciclooxigenasa (BAUMAN *et al.*, 1980), etc.

También los ácidos fenólicos ejercen actividad sobre enzimas, como pectinasas, amilasas vegetales, fenoloxidasas, succinato deshidrogenasa y RNasa pancreática (VAN SUMMERE, 1989). Asimismo, cabe comentar los efectos de los glicósidos de ácidos cinámicos sobre enzimas, como la aldosa reductasa, la c-AMP fosfodiesterasa (KITAGAWA *et al.*, 1984) y la 5-lipooxigenasa (KIMURA *et al.*, 1987).

## 2.7. APLICACIONES QUIMIOTAXONOMICAS

El desarrollo de las técnicas analíticas instrumentales, principalmente cromatográficas, ha permitido perfeccionar la taxonomía vegetal, introduciendo la moderna quimiotaxonomía, basada en los caracteres químicos dominantes de las especies e individuos. La Taxonomía o sistemática botánica clásica está basada en los caracteres morfológicos. Posteriormente, fueron considerados, además, los caracteres ecológicos, anatómicos, cariológicos y carpológicos. Modernamente, también se van teniendo en cuenta los caracteres químicos. Estos tienen la ventaja de ser más definidos y precisos, por corresponder a estructuras moleculares.

Para que un compuesto químico pueda ser considerado como caracter químico de una especie o individuo vegetal, esto es, ser considerado como marcador quimiotaxonómico, debe cumplir los siguientes requisitos (RIBEREAU-GAYON, 1968; HARBORNE, 1975):

1. Estar ampliamente extendido (en el reino vegetal).
2. No pertenecer a los grupos de componentes mayoritarios fundamentales, como los ácidos nucleicos, etc.
3. No tener una estructura demasiado compleja.
4. Deben ser específicos de especies (o individuos).
5. Ser fácilmente identificables y valorables.
6. Ser relativamente estables.
7. Intervenir en un número limitado de reacciones metabólicas y resultar de biosíntesis, con acumulación en la planta, independiente de influencias ambientales.

A continuación, se describen unos ejemplos que demuestran la amplia utilización de los compuestos fenólicos en Quimiotaxonomía, ya que cumplen satisfactoriamente los requisitos anteriores.

- Las diferentes variedades de manzana (género *Malus*) contienen una dihidrochalcona, la floridzina (heterósido de

la floretina); mientras la pera (género *Pyrus*) contiene arbutina (glucósido de la hidroquinona). Estos dos compuestos fenólicos no han sido detectados en ningún otro organismo vegetal.

- Las isoflavonas se encuentran frecuentemente en la familia de las Leguminosas y, particularmente, en las Papilionáceas. De igual manera, han sido encontradas en el género *Iris*, de las Monocotiledóneas (OLLIS, 1962).

- La presencia de biflavonoides está asociada a las Gimnospermas y, dentro de ellas, a las Pináceas (BAKER y OLLIS, 1961).

- Dentro de la familia de las Pináceas, los dihidroflavonoles (por ejemplo, la taxifolina) se encuentran en el género *Pinus*, y están ausentes en el género *Abies* (PACHECO, 1957).

- El ácido elágico se ha encontrado en las Rosáceas, específicamente, en la subfamilia de Rosoideas, más exactamente, en seis de las siete tribus que componen la subfamilia. Está ausente en la séptima tribu, lo que hace dudar de la relación de esta tribu con la subfamilia, por otro lado, muy homogénea (BATE-SMITH, 1962).

- En la actualidad, se están utilizando flavonas y flavonoles en el reconocimiento de parentescos entre híbridos (WEBBY *et al.*, 1987), y en el establecimiento de "huellas dactilares" de nuevos cultivares, para la identificación y el registro de estos (VAN SUMERE *et al.*, 1985).



## 2.8. APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

### 2.8.1. Propiedades gustativas

Una característica interesante de algunas flavanonas y dihidrochalconas es que poseen propiedades gustativas, siendo dulces, amargas o agridulces. Por ejemplo, la naringina, la poncirina, la neoeriocitrina y la neohesperidina son amargas. Estos compuestos son los 7-O-neohesperidósidos de naringenina, isosakuranetina, eriodictyol y hesperetina, respectivamente, (siendo la neohesperidosa, la 2-O- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucosa). Sin embargo, los correspondientes rutinósidos, narirrutina, didimina, eriocitrina y hesperidina son insípidos. La rutinosa es un disacárido muy similar a la neohesperidosa; su estructura es 6-O- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucosa. Por lo tanto, el punto de unión de la ramnosa a la glucosa, en posición 2 ó 6, es determinante del amargor o insipidez de estos compuestos (HOROWITZ, 1986).

Para establecer la relación entre sabor y estructura en flavanonas y dihidrochalconas, las flavanonas naringina y neohesperidina fueron convertidas en sus correspondientes glucósidos de dihidrochalcona, mediante apertura del anillo e hidrogenación catalítica de las primeras (HOROWITZ, 1986). Sorprendentemente, las dihidrochalconas eran intensamente dulces. La neohesperidina chalcona tiene un poder edulcorante 10 veces mayor que la naringina dihidrochalcona y del orden de 1000 a 2000 veces mayor que la sacarosa.

Dada la baja solubilidad de estos compuestos en medio ácido y el regusto a licor que dejan en los alimentos, se están introduciendo comercialmente otros derivados, como la 4'-NaO<sub>3</sub>S-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-hesperetina dihidrochalcona.

Existen muchos estudios que relacionan estructura con sabor; y listas de flavonoides con diferentes patrones de sustitución, y sus respectivos sabores: amargo, dulce o insípido. En ellas, se comprueba que pequeños cambios en las moléculas, por ejemplo, en

la naturaleza o posición de los azúcares y en los sustituyentes de los anillos A o B, provocan grandes cambios en sus propiedades gustativas (HOROWITZ, 1986; DICK, 1980).

### 2.8.2. Agentes antioxidantes

La actividad de los compuestos fenólicos depende de cuatro factores principales: las diferencias evolutivas en la tolerancia de los distintos organismos a estos compuestos; su estructura y concentración; y su estado de oxidación. Los compuestos fenólicos son oxidados por enzimas y oxidantes, presentes en el entorno, en plantas, suelos, sedimentos, agua, y en el tracto digestivo de hervíboros y carroñeros. APPEL (1993) expone ejemplos de sistemas, en los cuales, la actividad ecológica de los compuestos fenólicos depende de su activación oxidativa. Así, afectan a aspectos críticos de la supervivencia, crecimiento y reproducción de organismos, como sus preferencias alimentarias, el reconocimiento de huéspedes, la adquisición de nutrientes, la resistencia a enfermedades, la depredación y el parasitismo y las interacciones competitivas.

Para valorar la actividad de los compuestos fenólicos, se emplean, *in vitro*, diversidad de condiciones oxidativas, en las que los compuestos fenólicos manifiestan su efecto protector, por inhibición o bloqueo de radicales libres o compuestos oxigenados reactivos. En el caso de los flavonoides, hace mucho tiempo que está reconocida su actividad antioxidante hacia una amplia variedad de compuestos fácilmente oxidables (LARSON, 1988).

La síntesis de muchos flavonoides y otros compuestos fenólicos se ve fuertemente afectada por la luz. Por ejemplo, plantas de tabaco, sometidas durante su crecimiento a niveles suplementarios de luz UV, contienen una concentración de compuestos fenólicos, aproximadamente, doble que la de las plantas control (ANDERSEN y KASPERBAUER, 1971). Este aumento en la concentración de compuestos fenólicos representa un mecanismo de defensa de la planta frente al incremento de los procesos

oxidativos, potenciados por la luz UV.

Se ha medido la capacidad antioxidante de un grupo de flavonoides en un sistema de ensayo, que contiene dos lípidos, fácilmente oxidables: ácido linoleico y  $\beta$ -caroteno (PRATT, 1976). La actividad antioxidante se demostraba por la prolongación del tiempo necesario para decolorar la mezcla de ensayo, en presencia del antioxidante. Los compuestos que mostraron una actividad más alta fueron flavonoles con tres grupos hidroxilo libres en las posiciones 3',4',5' del anillo B. También mostraron actividades significativas, aunque ligeramente inferiores, los pentahidroxi-aglicones quercetina y dihidroquercetina; el quercetín-3-ramnósido, la ramnetina (tetrahidroxi-metoxi-flavona) y la fisetina (tetrahidroxiflavona). La rutina (quercetín-3-ramnoglucósido) y los flavonoides con menos de cuatro grupos hidroxilo mostraron una baja actividad.

Otros estudios han demostrado que la quercetina y la silimarina (complejo dihidroflavonol-derivado de lignano) presentan una capacidad prácticamente igual de inhibir la peroxidación de lípidos, en diferentes preparaciones microsomales y mitocondriales (CAVALLINI *et al.*, 1978).

TOREL *et al.* (1986) estudiaron la capacidad de varias series de flavonoides como inhibidores de la autooxidación de una emulsión de ácido linoleico y linoleato de metilo, a temperatura ambiente y en la oscuridad. Detectaron la máxima actividad en morina y kaempferol, y atribuyeron esta actividad a la capacidad de donar un átomo de hidrógeno al radical peroxi, generado en el proceso de autooxidación del ácido graso. Se ha demostrado (BAUMANN *et al.*, 1980) que algunos flavonoides actúan como potentes inhibidores de las enzimas lipooxigenasa y prostaglandina sintetasa, las cuales convierten ácidos grasos poliinsaturados en derivados oxigenados más reactivos. Luteolina y 3',4'-dihidroxiflavona mostraron la máxima actividad inhibidora. Los autores no establecen ninguna especulación sobre el posible mecanismo de inhibición de estas enzimas.

Varios flavonoides eliminan radicales hidroxilo originados en la fotólisis UV de  $H_2O_2$  (HUSAIN et al., 1987). La actividad decrece en el orden: miricetina > quercetina > ramnetina > morina > diosmetina > naringenina > apigenina > catequina > 5,7-dihidroxil-3',4',5'-trimetoxiflavona > robinina > kaempferol > flavona. El aumento del número de grupos OH en el anillo B incrementa la actividad. La presencia de OH en C<sub>3</sub>, o su glicosilación, no incrementa ese efecto. Estas conclusiones coinciden con las obtenidas en los procesos de autooxidación de ácido linoleico y  $\beta$ -caroteno (PRATT, 1976).

Cada vez, es más aceptada la teoría de que los flavonoides, con su fuerte absorción en la región UV de 300-400 nm, actúan como filtros internos, para proteger a los cloroplastos y otros orgánulos de los daños provocados por la luz UV (CALDWELL et al., 1983). Esta capacidad de filtración de la luz reforzaría su acción antioxidante, proporcionando un alto nivel de protección frente a sustancias oxidantes generadas, bien por la luz, bien por el calor. Este efecto de filtro puede estar relacionado con la variación de la concentración de flavonoides con la altitud (Mc.DOUGAL y PARKS, 1984). Así, en estudios realizados sobre el contenido de flavonoides en especímenes de *Quercus rubra*, localizados a distintas altitudes, dentro de los Apalaches, demuestran que, en individuos situados a gran altura, predomina el flavonoide miricetina, mientras en poblaciones que habitan en cotas inferiores, kaempferol y quercetina son los más abundantes. Esto refuerza la idea de que la miricetina, con tres hidroxilos adyacentes, es uno de los antioxidantes más activos, dentro del grupo de los flavonoides.

En cuanto a los ácidos fenólicos, cabe decir que todos los compuestos ácidos que contienen grupos fenólicos, se comportan como activos antioxidantes. Entre ellos, el ácido clorogénico, el ácido fenólico más abundante en los vegetales, es también el más antioxidante (HAYASE y HATO, 1984).

Por otro lado, se ha demostrado el efecto protector de los

ésteres del ácido caféico con esteroides y alcoholes triterpénicos, aislados de semillas de *Phalaris canariensis*, frente a la oxidación de ácidos grasos (TAKAJI y IIDA, 1980). De manera parecida, el ácido ferúlico y sus ésteres con triterpenos y esteroides presentan actividad antioxidante (YAGI y OHISHI, 1979).

### 2.8.3. Colorantes naturales

Dentro de la industria alimentaria, se está difundiendo el empleo de antocianinas, como colorantes naturales, que sustituyan a los tintes rojos sintéticos (HARBORNE y GRAYER, 1988). El problema de la utilización de las antocianinas, como colorantes de alimentos y bebidas, es la inestabilidad de sus soluciones frente a cambios de pH, o por acción de la luz y, especialmente, la decoloración ocasionada por dióxido de azufre que se suele añadir como conservante. Esta inestabilidad puede evitarse haciendo reaccionar las antocianinas con compuestos carbonílicos, como el acetaldehído que las estabilizan. Otra posibilidad es utilizar antocianinas aciladas, más estables a la luz que los glicósidos (TIMBERLAKE y HENRY, 1986).

El estudio de las antocianinas tiene especial interés en la industria vitivinícola. Se ha demostrado la importancia del análisis de estos compuestos en la diferenciación de los vinos tintos, para determinar las variedades de uvas usadas en la manufactura del vino, y para detectar la adición de colorantes exógenos (RIBEREAU-GAYON, 1982).

### 3. COMPUESTOS FENOLICOS EN EL GENERO *EUCALYPTUS*

Clasificamos la información disponible sobre composición polifenólica del género *Eucalyptus*, teniendo en cuenta la parte del árbol analizado, debido a que la naturaleza de los estudios realizados es muy distinta según que se trate de madera y corteza, o de hojas o de resina.

#### 3.1. MADERA

Existen pocos estudios sobre la composición química de la madera del género *Eucalyptus*. La mayoría de ellos se refieren, exclusivamente, a contenidos de cenizas, extractos totales, lignina, celulosa y pentosanós. De estos estudios se deduce la existencia de diferencias en la composición de las distintas especies, entre árboles de una misma especie e incluso dentro del mismo árbol (BLAND, 1985; PEREIRA, 1988).

La información disponible sobre componentes polifenólicos es más escasa. En cuanto a ácidos fenólicos, se ha detectado la presencia de ácido elálgico y ácido gálgico en *E. sideroxylon* (HILLIS et al., 1974), *E. globulus* y *E. regnans*, así como de trazas de ácido clorogénico en *E. globulus* (YAZAKI y HILLIS, 1976). Les acompañan derivados metilados y glicosilados del ácido elálgico, junto a diversos elagitaninos.

Se ha desarrollado un método de valoración cuantitativa de ácidos gálgico y elálgico en madera de *E. globulus* (CHARRIER et al., 1992).

En cuanto a flavonoides, se ha citado la presencia de catequina en *E. sideroxylon* (HILLIS et al., 1974), acompañada de galocatequina en *E. globulus*, *E. regnans* y *E. deglupta* (YAZAKI y HILLIS, 1976). También se ha detectado azfelequina en madera de *E. calophylla* (HILLIS y CARLE, 1960).

### 3.2. CORTEZA

Se ha detectado la presencia de varios ácidos fenólicos en corteza de diversas especies de *Eucalyptus*. Entre ellos, y coincidiendo con los resultados de los estudios de madera, se destacan los ácidos gálico y elágico en *E. globulus* y *E. regnans*, y trazas de ácido clorogénico en *E. globulus* (YAZAKI y HILLIS, 1976).

Otro ácido identificado es el *p*-hidroxicinámico, que se ha citado junto al ácido elágico en corteza de *E. maculata* (GELL et al., 1958).

Existen estudios parciales sobre el contenido de flavonoides, que han permitido identificar isosakuranetina y leucopelargonidín-3-O- $\alpha$ -L-ramno- $\beta$ -D-glucopiranosido (MISHRA y MISRA, 1980), naringenina y 7-metilaromadendrina (GELL et al., 1958) en *E. maculata*; así como catequina y galocatequina en *E. globulus* y *E. regnans* (YAZAKI y HILLIS, 1976).

Por otra parte, SHARMA y CROWDEN (1974) desarrollaron un estudio comparativo sobre las antocianinas de diversas especies de dos secciones: *Macrantherae* y *Renantherae*, del género *Eucalyptus*. De sus resultados, se deduce que la antocianina más frecuente, en todas las especies estudiadas, es el cianidín-3-glucósido, acompañada del cianidín-3,5-diglucósido, en las especies de la sección *Macrantherae*; y del delfinidín-3-glucósido, en las de la sección *Renantherae*.

### 3.3. HOJAS

La información disponible sobre los flavonoides, presentes en las hojas, es más abundante que la existente sobre los de madera y corteza.

Como característica más destacada del género *Eucalyptus*, se reconoce la presencia de flavonas C-metiladas en posiciones C<sub>6</sub> y

C<sub>8</sub> en la cubierta epicuticular de ceras (pruina) de las hojas de diversas especies. Así, están identificadas eucaliptina (5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-6,8-dimetilflavona) en varias especies de *Eucalyptus* (LAMBERTON, 1964; CERECER et al., 1974) y 8-desmetileucaliptina (5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-6-metilflavona) en la pruina de las hojas de *E. torelliana* y *E. urnigera* (HORN et al., 1964). El número de especies en las que se han encontrado estos dos compuestos fue ampliado por COURTNEY et al. (1983) que identificaron eucaliptina en *E. eximia*, *E. elata*, *E. gummifera*, *E. maculata*, *E. haemastoma*, *E. luehmanniana*, *E. youmanii* y *E. michaeliana*; mientras la 8-desmetileucaliptina se encontró únicamente en *E. michaeliana* y *E. youmanii*.

Por otra parte, en *E. sideroxylon* fue detectada la presencia de 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-6,8-dimetilflavona (sideroxilina) (HILLIS e ISOI, 1965). En estudios más recientes se identificó la 8,4'-dihidroxi-7-metoxi-6-metilflavona (8-desmetilsideroxilina) en la pruina de hojas de *E. globulus*, acompañada de pequeñas cantidades de crisina (WOLLENWEBER y KOHORST, 1981).

Se han identificado algunos glicósidos de flavona (apigenín-7-glucurónido, luteolín-7-glucósido y 7-glucurónido) en hojas de *E. camaldulensis*, sólo en trazas (ABD-ALLA et al., 1980).

En cuanto al grupo de flavanonas, se han identificado, en hojas de *E. sieberi*, tres flavanonas muy poco frecuentes en la naturaleza: alpinetina, pinocembrina y O,O-dimetilpinocembrina (BICK et al., 1972).

El aglicón de flavonol, más frecuentemente encontrado en hojas de *Eucalyptus*, es la quercetina (ELKEIY et al., 1964; HILLIS, 1966; BANKS y HILLIS, 1969; BOUKEF et al., 1976). Los glicósidos de flavonol más abundantes son los 3-glucósidos, 3-ramnósidos, 3-rutinósidos y 3-glucurónidos de kaempferol (HILLIS e ISOI, 1965; ABD-ALLA et al., 1980), quercetina (HILLIS y HINGSTON, 1963; ELKEIY et al., 1964; HILLIS e ISOI, 1965; BOUKEF et al., 1976; ABD-ALLA et al., 1980; MANSOUR, 1986) y miricetina



(HILLIS y HINGSTON, 1963; ABD-ALLA *et al.*, 1980). OKAMURA *et al.* (1993) describen la presencia de unos derivados acilados, con el ácido gálico, de glicósidos de quercetina y kaempferol, en hojas de *E. camaldulensis*.

Del grupo de los dihidroflavonoles, sólo cabe nombrar la aromadendrina (dihidrokaempferol), encontrada en hojas de *E. flocktoniae*, *E. salubris* (HILLIS y HINGSTON, 1963) y *E. sideroxylon* (HILLIS e ISOI, 1965).

En cuanto a los ácidos fenólicos, está descrita la presencia de ácido elágico en hojas de *E. globulus* (OSAWA y NAMIKI, 1985).

### 3.4. "KINO"

El "kino" es un material resinoso, característico del género *Eucalyptus*, en el que se han identificado:

- Sakuranetina, en *E. calophylla* (GANGULY y SESHADRI, 1961).
- Naringenina, en *E. maculata* (GELL *et al.*, 1958).
- Aromadendrina, en *E. calophylla* (GANGULY y SESHADRI, 1961), *E. corymbosa* (HILLIS, 1952), *E. hemiphloia* (HILLIS y CARLE, 1963).
- 7-metilaromadendrina, en *E. citriodora* (SATWALEKAR *et al.*, 1957) y en *E. maculata* (GELL, 1958).

Sakuranetina, aromadendrina, 7-metilaromadendrina y 3-metilaromadendrina han sido detectados también en árboles enfermos de varias especies (*E. citriodora*, *E. tereticornius*, *E. globulus* y *E. pulvulentus*), lo cual se relaciona con las funciones protectoras de estos compuestos (ECHEVERRI *et al.*, 1985, 1986).

### **III. MUESTRAS**

### III. MUESTRAS

#### 1. SELECCION DE MUESTRAS

Para la puesta a punto de los métodos de extracción y análisis, se utilizaron muestras tipo de madera y corteza de *Eucalyptus globulus*, procedentes de Galicia (sin especificación del origen exacto), suministradas por el Laboratorio de Pastas del Dpto. de Industrias Forestales del CIT-INIA.

El estudio se ha realizado con muestras de madera, corteza y hojas de tres especies del género *Eucalyptus*: *E. globulus*, *E. camaldulensis* y *E. rudis*. Las muestras fueron recogidas en estaciones de dos regiones de la Península Ibérica, con características edafoclimáticas muy diferentes, localizadas en las provincias de Huelva y Pontevedra.

En Huelva, se seleccionó el arboreto de "El Villar", donde se cultivan ejemplares de las tres especies. No obstante, al observar que la población de *E. globulus* estaba afectada de *phoracantha*, únicamente se tomaron muestras de *E. camaldulensis* y *E. rudis*. El muestreo de *E. globulus* se tuvo que realizar en el arboreto de "Bodegones" (La Soldana).

Todas las muestras de Pontevedra fueron recogidas en el arboreto de "Lourizan".

La figura III.1. recoge las características fitoclimáticas de las zonas de ensayo. Los datos proceden de las estaciones meteorológicas más próximas a cada uno de los arboretos. Lourizan y El Villar poseen estación meteorológica propia, mientras la estación más cercana a Bodegones es la del arboreto de Cabezudos, contiguo a este. De acuerdo con la clasificación fitoclimática de ALLUE (1990), el arboreto de Lourizan pertenece al subtipo climático nemoral VI(V); y los de El Villar y Bodegones, a los subclimas mediterráneos IV<sub>2</sub> y IV<sub>2</sub>-IV<sub>4</sub>, respectivamente.

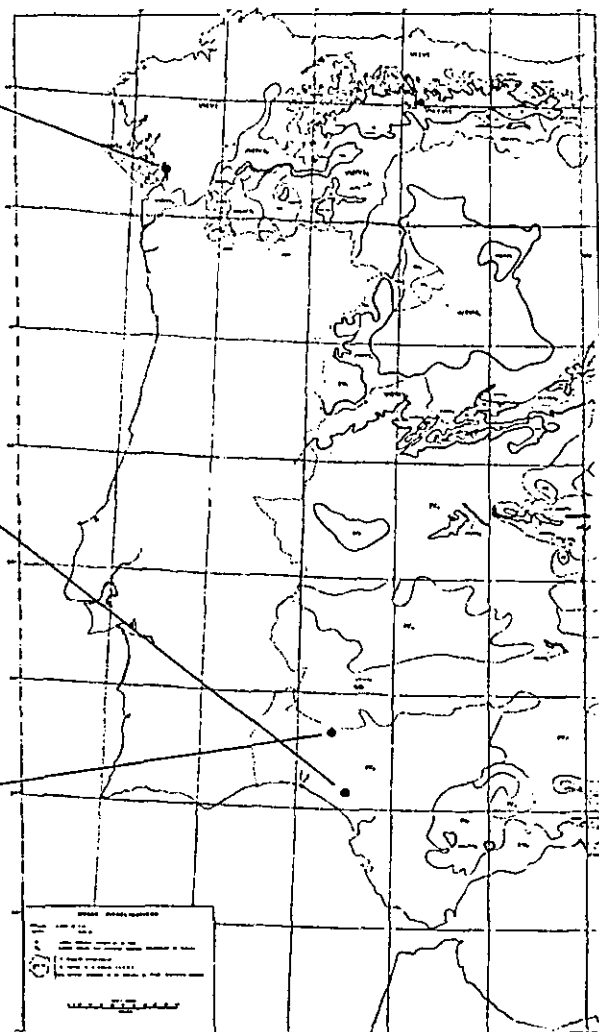
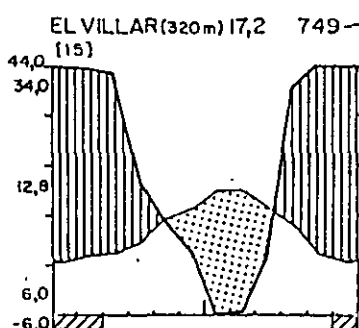
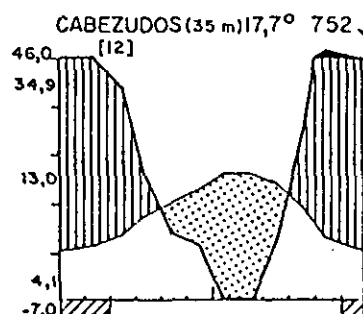
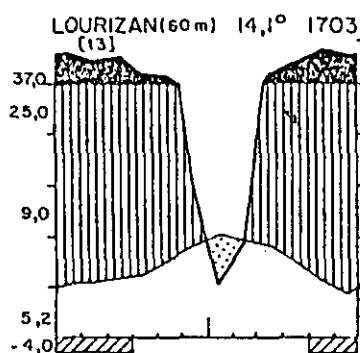
# ESTACIONES METEOROLOGICAS ESTUDIADAS:

PONTEVEDRA: LOURIZAN

HUELVA: CABEZUDOS, EL VILLAR

## SUBTIPOS FITOCLIMATICOS (ALLUE,1990)

- DESERTICOS
- 1 III (IV)
- MEDITERRANEOS
- 2 IV (III)
- 3 IV<sub>1</sub>
- (arbóreo)
- 4 IV<sub>2</sub>
- 5 IV<sub>3</sub>
- 6 IV<sub>4</sub>
- 7 IV (VI)<sub>1</sub>
- 8 IV (VI)<sub>2</sub>
- 20 IV (VII)
- NEMOROMEDITERRANEOS
- 9 VI (IV)<sub>1</sub>
- 10 VI (IV)<sub>2</sub>
- 11 VI (IV)<sub>3</sub>
- 12 VI (IV)<sub>4</sub>
- NEMOROESTEPARIOS
- 13 VI (VII)
- NEMORALES
- 14 VI (V)
- 15 VI
- BOREALOIDES
- 16 VIII (VI)
- 17 X (VIII)
- ARTICOIDES
- 18 X (IX)<sub>1</sub>
- 19 X (IX)<sub>2</sub>



Situación de las ESTACIONES estudiadas en el mapa de SUBREGIONES FITOCLIMATICAS DE ESPAÑA (ALLUE ANDRADE,1990) y climodiagramas correspondientes.

FACTORES	ESTACIONES		
P, precipitación anual	LOURIZAN	CABEZUDOS	EL VILLAR
p <sub>i</sub> , precipitación en cada mes (i)	1703	752	749
A, período seco (meses)	medir en climod.	medir en climodiag.	medir en climodiag.
T̄, temperatura media anual	1,7	5,0	4,3
t̄ <sub>i</sub> , temperatura media de cada mes (i)	14,1°	17,7°	17,2°
īf, temperatura media mensual más baja	medir en climod.	medir en climodiag.	medir en climodiag.
T̄m, temperatura media de las mínimas del mes de media más baja	8,9°	9,7°	10,7°
Tm, temperatura mínima absoluta del período	5,2°	4,1°	6,0°
Hs, meses de helada segura (en los que Tm ≤ 0°)	-4,0°	-7,0°	-6,0°
Hp, meses de helada probable (en los que Tm > 0° pero TM ≤ 0°)	0	0	0
t̄ <sub>e</sub> , temperatura media mensual más alta	5	3	3
T̄M, temperatura media de las máximas del mes de media más alta	19,9°	25,0°	26,1°
TM, temperatura máxima absoluta del período	25,0°	34,9°	34,0°
Ōsc, media anual de la oscilación térmica diaria	37,0°	46,0°	44,0°
	9,0°	13,0°	12,8°
DIAGNOSIS FITOCLIMATICA	VI(V)	IV <sub>2</sub> →IV <sub>4</sub>	IV <sub>2</sub>

Figura III.1: Fitoclimatología de las zonas de ensayo.

En cada zona se seleccionaron, al azar, varios individuos de cada especie, con características morfológicas semejantes. De cada individuo se recogieron: corteza del tronco, arrancada manualmente, y ramas completas, de las que se separaron las hojas y la madera, libre de corteza. Se estudió la madera de ramas, en lugar de la del tronco, por la imposibilidad de talar árboles para la realización de este estudio.

Consideramos más representativa la corteza de tronco que la de rama, ya que la diferenciación celular de la primera es mucho mayor.

Para que el muestreo fuese lo más homogéneo posible, se seleccionaron ejemplares de, aproximadamente, la misma edad, con diámetro de tronco semejante y ramas accesibles. Este criterio no pudo mantenerse con *E. rudis* de Pontevedra, cuyo escaso desarrollo, debido a una deficiente aclimatación, obligó a escoger ejemplares menos robustos y más jóvenes.

## 2. CARACTERIZACION DE MUESTRAS

### 2.1. CARACTERIZACION DE HOJAS. ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES

Conocida la importancia de los terpenoides, constituyentes básicos de los aceites esenciales de las hojas, en la quimiotaxonomía y la industria (VON RUDLOFF, 1969; CARMAN, 1992), hemos considerado interesante la caracterización previa de las muestras de hojas mediante el análisis de sus aceites esenciales.

Para la obtención de los aceites esenciales, las hojas fueron destiladas, por cohobación, durante 3 h, en un aparato de vidrio tipo Clavenger, como el prescrito por la Farmacopea Europea. Los aceites esenciales obtenidos se analizaron por cromatografía de gas (CG) y espectroscopía infrarroja (EIR).

El análisis cromatográfico se realizó con un cromatógrafo

equipado con detector de ionización de llama y columna capilar de 50 m x 0,25 mm, con fase ligada de "Carbowax 20M"; utilizando He como gas portador, con un flujo, a través de la columna de 1,2 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 70 °C durante 10 min, elevándola a continuación hasta 230 °C, con un gradiente de 2,5 °C/min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 225 y 250 °C, respectivamente.

La identificación de los componentes de los aceites esenciales se llevó a cabo por comparación de sus índices de retención cromatográfica y de sus espectros IR con los de patrones y/o los bibliográficos. Para la obtención de los espectros IR, los componentes, presentes en los aceites en concentraciones superiores al 0,5 %, fueron aislados, en estado puro, por CG preparativa, utilizando un cromatógrafo equipado con detector de conductividad térmica y columnas de 4 m x 30 mm, rellenas de "Carbowax 20M" al 10 % sobre "Chromosorb W", en condiciones de trabajo semejantes a las de CG analítica, a excepción del flujo de gas portador que fue de 25 ml/min.

## **2.2. CARACTERIZACION DE MADERAS. DETERMINACIONES QUIMICAS. NORMAS**

Para la caracterización previa de las muestras de madera, se realizaron ensayos normalizados de determinación de humedad, cenizas, solubilidades en agua fría y caliente, en sosa, extractos en alcohol-benceno (1:2), y contenidos de ligninas, holocelulosa y pentosanos.

El cuadro siguiente indica las normas utilizadas para cada determinación.

Determinación	Norma
Humedad	Tappi-T-11 wd-76
Cenizas	Tappi-T-15 wd-80
Solubilidad en agua fría	Tappi-T-207 om-88
Solubilidad en agua caliente	Tappi-T-207 om-88
Solubilidad en NaOH 1%	Tappi-T-4 wd-75
Extracto en alcohol-benceno	Tappi-T-6 wd-73
Ligninas	Tappi-T-13 wd-74
Holocelulosa	P. Trade J. 122 - nº2 35-43 (10-1-46)
Pentosanos	Tappi-T-223 os-78

El esquema del proceso se representa en la figura III.2.

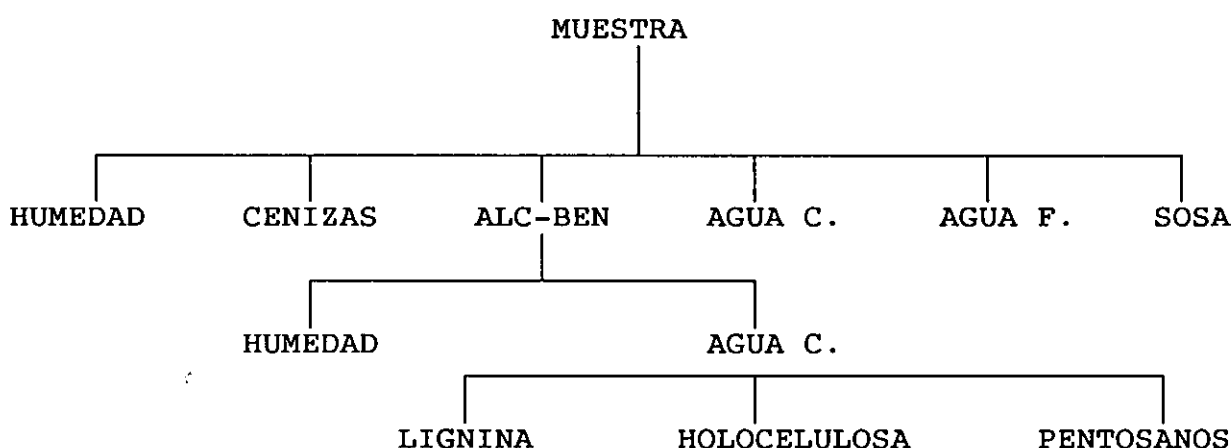


Figura III.2: Esquema de análisis químicos de caracterización de maderas.

Los procedimientos utilizados se describen a continuación.

- HUMEDAD (Tappi-T-11 wd-76)

En pesasustancias, se pesan aproximadamente 2 g de muestra. Se seca en estufa, a 100-105 °C, hasta pesada constante. La humedad se expresa en porcentaje de muestra.

- CENIZAS (Tappi-T-15 wd-80)

El contenido de cenizas de una madera se define como el residuo remanente después de la ignición a  $575 \pm 25$  °C durante tres horas, o más tiempo, si fuese necesario, para

consumir todo el carbón. Es una medida del contenido de sales minerales de la madera, pero no siempre es cuantitativamente igual a éste.

La determinación de las cenizas se realiza de la siguiente forma: en cápsula de porcelana, se pesan aproximadamente 2 g de muestra (con una precisión de 0,1 mg). La cápsula se introduce en la mufla a 300 °C hasta que las muestras dejan de humear, y, a continuación, se eleva la temperatura hasta  $575 \pm 25$  °C durante 3 h. El residuo que queda en la cápsula debe ser blanco. Si está coloreado, se añaden unas gotas de HCl concentrado para favorecer la eliminación de materia orgánica residual, y se vuelve a introducir en la mufla a  $575 \pm 25$  °C.

La cápsula se deja enfriar en desecador, y se pesa. El porcentaje de cenizas se refiere al peso de muestra seca.

#### - SOLUBILIDADES

La solubilidad de la madera en agua se determina habitualmente, después de la extracción con disolventes orgánicos, como el alcohol o alcohol-benceno. El extracto acuoso contiene sales orgánicas, azúcares, ciclitos, gomas, materiales pectínicos y galactanos, y, en el caso de que la madera no haya sido extraída previamente, arrastra también taninos y pigmentos.

El agua caliente hidroliza también polisacáridos y otros componentes, e incrementa la solubilidad.

Las soluciones de álcali calientes extraen carbohidratos de bajo peso molecular, formados principalmente por hemicelulosas y celulosa degradada. La solubilidad en sosa de la madera puede indicar el grado de ataque por hongos, degradación por luz, oxidación, etc. que ésta haya experimentado. Cuanto mayor es la degradación de la madera mayor es su solubilidad en sosa.

A continuación, se exponen los métodos utilizados para la determinación de cada una de estas solubilidades.



### 1. EN AGUA CALIENTE (Tappi-T-207 om-88)

Se pesan aproximadamente 2 g de muestra en vaso de 250 ml (la precisión de las pesadas es de 1 mg). Se añaden 100 ml de H<sub>2</sub>O, y se calienta en baño maría, a 100 °C, durante 3 h, agitando frecuentemente. Pasado este tiempo, se filtra la muestra a través de un crisol con placa filtrante del nº 1 ó 2, pesado previamente. El residuo filtrado se lava con 500 ml de agua caliente. El crisol, con el residuo, se seca en la estufa a 100-105 °C, durante 24 h. Se enfría en un desecador y se pesa.

La solubilidad se calcula por diferencia de pesada y se expresa en porcentaje de muestra seca.

### 2. EN AGUA FRÍA (Tappi-T-207 om-88)

Se pesan aproximadamente 2 g de muestra en matraz redondo de 500 ml, y se añaden 300 ml de H<sub>2</sub>O destilada. El matraz se mantiene en agitación durante 48 h, a temperatura ambiente. Después, se filtra la muestra a través de un crisol con placa filtrante del nº 1 o 2, pesado previamente, y se lava el residuo con agua fría.

El crisol, con el residuo, se deseca en estufa a 100-105 °C, durante 24 h. Se enfría en desecador, y se pesa. La solubilidad, calculada por diferencia de pesada, se expresa en porcentaje de muestra seca.

### 3. EN SOSA AL 1 % (Tappi-T-4 wd-75)

Se pesan aproximadamente 2 g de muestra (con precisión de 1 mg) en vaso de 250 ml, y se añaden 100 ml de solución acuosa de NaOH al 1 %. Se tapa con vidrio de reloj; y se calienta al baño maría a 100 °C, durante 1 h y con agitación frecuente. La muestra se filtra a través de un crisol con placa filtrante del nº 1 o 2, pesado previamente. El residuo retenido en la placa, se lava con 50 ml de ácido acético 2 N para neutralizarlo, y con agua caliente. El crisol, con el residuo, se deseca en estufa a 100-105 °C durante 24 h y, posteriormente, se enfría en desecador y se pesa.

La solubilidad se calcula por diferencia de pesada, y

se expresa en porcentaje referido al peso de muestra seca.

- EXTRACTOS EN ALCOHOL-BENCENO (1:2) (Tappi-T-6 wd-73)

El extracto en alcohol-benceno contiene ceras, grasas, resinas y sustancias insolubles en éter, como "gomas" de madera, y sustancias solubles en agua.

Para su determinación, se introducen 10-12 g de muestra en el cuerpo intermedio de un extractor Soxhlet y se extraen con etanol de 96°-benceno (1:2), durante 6 h. El extracto se trasvasa a un matraz de 250 ml pesado con anterioridad.

Se elimina el alcohol-benceno por destilación, y el residuo semiseco se termina de secar en estufa a 100-105 °C durante 1 h, teniendo cuidado de que no se queme. El matraz con el residuo se seca en desecador y se pesa.

El porcentaje de extracto se refiere a peso de muestra seca.

Para las determinaciones de lignina, holocelulosa y pentosanos, las muestras deben haber sido extraídas previamente con alcohol-benceno y agua caliente, como se indicó en el esquema del método.

- LIGNINAS (Tappi-T-13 wd-74)

La madera contiene de un 20 a un 30 % de lignina, cuya eliminación es el objetivo primordial de los procesos de producción de pasta y blanqueo.

La lignina forma parte de la pared celular y de la lamela media de la madera. Es un compuesto aromático, con grupos metoxilo e hidroxilo, cuya estructura química no esta bien elucidada.

Cuando la madera se trata con ácidos fuertes, los hidratos de carbono se hidrolizan, quedando un residuo insoluble de lignina. En este método de determinación, se define la lignina Klason como el constituyente de la madera insoluble en  $H_2SO_4$  al 72 %. Puesto que algunas de las sustancias que forman parte de los extractos podrían permanecer insolubles en el ácido, acompañando a la lignina,

deben ser eliminadas previamente con disolventes adecuados.

Para valorar el contenido de ligninas, se aplica el siguiente método. Se pesa 1 g de muestra en un vaso de 100 ml, se añaden 15 ml de  $H_2SO_4$  al 72 % y se mantienen durante 2 h con agitación esporádica.

A continuación, se trasvasa la mezcla a un matraz de 2 l, con 560 ml de  $H_2O$ . Se hierve a reflujo durante 4 h (hidrólisis de los azúcares unidos a las ligninas). Hay que tener cuidado, en la primera parte del proceso de calentamiento, por la formación de espumas, que deben eliminarse, por agitación, antes de colocar el refrigerante.

La muestra se filtra a través de un crisol con placa filtrante del nº 3, pesada previamente, y el residuo filtrado (lignina Klason) se lava con agua caliente hasta pH neutro. El crisol, con el residuo, se deseca en estufa, a 100-105 °C, durante 24 h. Se enfría en desecador y se pesa.

El porcentaje de lignina, referido a madera seca sin extraer, se calcula por la fórmula:

$$\% = \frac{h \times (\%P)}{P'}$$

donde:

h = peso del residuo final del ensayo

%P = porcentaje de madera sin extractos

P' = peso de muestra seca

- HOLOCELULOSA (P. Trade J. 122 nº 2-35-43) (10-1-46)

Se define la holocelulosa como el conjunto de celulosa y hemicelulosa. Para su determinación, se procede del modo siguiente. Se pesan 5 g de muestra en un erlenmeyer de 250 ml, y se vierten sobre ellos 160 ml de  $H_2O$  destilada. La mezcla se pone a calentar en baño maría estabilizado a 75-80 °C. Se le añaden 10 gotas de ácido acético glacial y 1,5 g de clorito sódico (siempre en este orden). Se tapa el matraz con otro erlenmeyer más pequeño, colocado en sentido inverso.

Se agita periódicamente y, cada hora, se añaden nuevas dosis de ácido acético y clorito sódico, hasta blanqueo de la muestra (unos tres tratamientos).

Una vez finalizado este proceso, el matraz se enfría en agua muy fría y la muestra se filtra a través de un crisol

con placa filtrante del nº 1 ó 2, pesada previamente. El residuo se lava sucesivamente con agua fría, un poco de acetona y agua fría. El crisol, con el residuo, se deseca a 100-105 °C durante 24 h, se enfría y se pesa.

El porcentaje de holocelulosa (% de residuo) se refiere a muestra de madera seca y sin extraer.

Este proceso, en el que se genera dióxido de cloro, es el empleado habitualmente para el blanqueo de la pasta de celulosa, obtenida industrialmente.

- PENTOSANOS (Tappi T-223 os-78).

La madera contiene una cierta cantidad de hidratos de carbono, no celulósicos, llamados hemicelulosa. La hemicelulosa de maderas blandas (coníferas) está formada por pentosanos (xilano y arabano) y hexosanos (manano y galactano); y la de maderas duras (frondosas) está formada principalmente por pentosanos. Las maderas blandas contienen de 7-10 % de pentosanos, y las duras, de 19-25 %.

El método empleado para la determinación de pentosanos se basa en la hidrólisis de ellos a furfural, por ebullición con HCl 3,85 N. El furfural se separa por destilación, y se valora colorimétricamente con orcinol-FeCl<sub>3</sub>.

Los reactivos necesarios son:

- HCl 3,85 N (13,15 %)
- Reactivo orcinol: 0,4 g de orcinol y 0,5 g de FeCl<sub>3</sub> en 100 ml de HCl 11 N (915 ml por l). Se guarda en frigorífico, y no debe usarse pasadas dos semanas.
- Etanol al 95 %
- Xilosa

Se pesan 0,5 g de muestra en un matraz de fondo redondo, y se le añaden 100 ml de HCl 3,85 N. Se adaptan un refrigerante y un embudo de llave graduado al matraz, que se calienta con una manta calefactora, de forma que la destilación transcurra uniformemente, a una velocidad de 2,5 ml/min.

El destilado se recoge en un matraz aforado inmerso en

un baño de hielo. Durante la destilación, se van añadiendo, mediante el embudo de llave, 25 ml de HCl por cada 25 ml de destilado.

Se destila durante 90 min, hasta obtener un volumen de destilado de  $225 \pm 10$  ml. Se añade HCl 3,85 N al destilado, hasta completar los 250 ml.

De estos 250 ml, se toman 5 ml, que se transfieren a un matraz aforado de 50 ml y se les añade 25 ml del reactivo de orcinol. Esta mezcla se agita y mantiene a 25 °C durante 1 h. Pasado este tiempo, el matraz de 50 ml se enrasa con etanol y se deja otra hora a 25 °C, midiendo a continuación su absorbancia a 630 nm en el colorímetro.

Para la preparación del blanco, se sustituyen los 5 ml de destilado por 5 ml de HCl 3,85 N que se tratan igualmente que la muestra.

La curva de calibrado se prepara previamente, a partir de xilosa patrón. Para ello, se deseca la xilosa en estufa a 60 °C, durante 4 h. Se pesan distintas cantidades de este compuesto entre 10-100 mg, y se someten al proceso de destilación, descrito anteriormente. Se mide el color de los derivados de furfural obtenidos, a 630 nm, y se representan las  $A_{630}$  frente a los mg de xilosa.

Por interpolación en la curva de calibrado, se determina el contenido de xilosa de la muestra problema y, con este valor, se calcula el % de pentosanos, mediante la fórmula:

$$\%Pentosanos = \frac{A}{10W}$$

donde:

A = mg de xilosa en la muestra problema

W = peso seco de muestra problema

#### **IV. EXTRACCION**

#### IV. EXTRACCION

##### 1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Son muchos los disolventes, puros o mezclados entre sí, citados en la bibliografía para la extracción de polifenoles. Su elección suele estar condicionada por el tipo de extracción que se pretenda realizar: generalizada o selectiva de distintos grupos, según su polaridad. Los disolventes más empleados, nombrados en el orden de mayor a menor frecuencia de utilización, son: metanol, etanol, acetona, agua y soluciones acuosas alcalinas; y tras ellos, otros disolventes menos habituales, como hexano, benceno, THF, etc.

##### A. METANOL

Los métodos que utilizan este disolvente se pueden clasificar en:

- 1) Métodos directos, en los que el MeOH se aplica directamente sobre la muestra sin tratar.
- 2) Métodos indirectos, en los que la muestra se somete a un tratamiento previo de eliminación de compuestos apolares (grasas, ceras, clorofilas, etc.) que podrían enmascarar la detección de polifenoles.

##### A.1. METODOS DIRECTOS

##### A.1.1. Extracción de hojas

Se pueden destacar los métodos descritos por MARTINEZ (1980), BICK *et al.* (1972) y ADZET *et al.* (1988), con fases posteriores de purificación del extracto con éter de petróleo.

En algunos casos, se utilizan mezclas binarias de MeOH con otros disolventes: MeOH-H<sub>2</sub>O (4:1) (TOMAS-BARBERAN *et al.*, 1988); MeOH al 80 % (MCDUGAL y PARKS, 1984); MeOH-HCl,

para extracción de antocianidinas (MARKHAM, 1982) o hidrólisis simultánea (HASLER *et al.*, 1990).

#### A.1.2. Extracción de raíces

Está descrita la utilización de MeOH-H<sub>2</sub>O (8:2) (KHETWAL *et al.*, 1988) para la extracción de polifenoles de raíces.

#### A.1.3. Extracción de corteza

YAZAKI y HILLIS (1976) y NISHINO *et al.* (1987) utilizan MeOH para la extracción de corteza de diversas especies.

#### A.1.4. Extracción de bulbos

SACHSE (1988) utiliza MeOH, al 70 %, para extraer flavonoides de patata.

#### A.1.5. Extracción de flores

Está descrita la utilización de MeOH-HCl (SCHRAM *et al.*, 1987) para la extracción de polifenoles de flores.

#### A.1.6. Extracción de madera

Los métodos más importantes, entre los descritos para este tipo de material, son los de HILLIS *et al.* (1974), YAZAKI y HILLIS (1976), y TAKEDA *et al.* (1977). Todos ellos emplean MeOH puro.

#### A.1.7. Extracción de partes aéreas de planta (sin especificar)

Han utilizado el MeOH: BONDARENKO *et al.* (1981), CARPENA *et al.* (1980), EL-KOMMOS y SIDHOM (1978), SAKUSHIMA y NISHIBE (1988), BROWNING (1967), WELLS y BOHM (1988). También se describen mezclas de MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1) (MARKHAM, 1982, *et al.*, 1990) y (8:2) (MUES, 1988).

#### A.1.8. Extracción de semillas

En este caso, está descrito también el empleo de MeOH-HCl (MCMURROUGH, 1981) para la extracción de polifenoles de semillas.



## A.2. METODO INDIRECTO

Este tipo de procedimientos ha sido descrito para la extracción de hojas (MARTINEZ, 1980) y de semillas (WOO, 1979), utilizando éter de petróleo para el desengrasado. BOUKEF (1976) utiliza  $\text{CHCl}_3$ , en lugar de éter de petróleo, para la fase inicial de limpieza. En otros casos, el desengrasado se realiza con mezclas de éter de petróleo y éter etílico (1:1) (CARPENA *et al.*, 1980).

## B. ETANOL

Como en el caso del MeOH, se describen métodos directos e indirectos (con fase previa de limpieza y desengrasado).

### B.1. METODOS DIRECTOS

#### B.1.1. Extracción de hojas

Normalmente, el etanol se emplea en forma de mezclas hidroalcohólicas, como EtOH al 80 % (ABD-ALLA *et al.*, 1980, ISHIKURA *et al.*, 1976), al 70% (EL-GAMMAL y MANSOUR, 1986; SALEH *et al.*, 1988), y al 60 % (BOUKEF *et al.*, 1976; BOYET y JAY, 1989).

#### B.1.2. Extracción de frutos

ZHANG *et al.* (1988) emplean EtOH absoluto para extraer flavonoides de frutos.

#### B.1.3. Extracción de raíces

PIETTA *et al.* (1983) utiliza EtOH, al 50 %, para extraer polifenoles de raíces molidas.

#### B.1.4. Extracción de madera

Está descrito el empleo de EtOH, al 80 %, para la extracción de polvo de diversas maderas exóticas (MARINI BETOLO *et al.*, 1981).

#### B.1.5. Extracción de corteza

Para la extracción de polifenoles de corteza, se usan tanto EtOH absoluto (MISHRA y MISRA, 1980) como EtOH al 70% (SALEH et al., 1988).

#### B.1.6. Extracción de partes aéreas de planta (sin especificar)

Esta descrita la utilización de EtOH, sólo o mezclado con otros disolventes, en frío y en caliente:

- EtOH sólo:

- En frío: ALBORNOZ (1980) utiliza EtOH al 95 %, mientras TOMAS-LORENTE et al. (1981) lo hacen con EtOH al 70 %.

- En caliente: Se han utilizado EtOH absoluto (MARIGO, 1973) y EtOH al 95 % (BONDARENKO, 1984; BROWNING, 1967).

- EtOH mezclado con otros disolventes: EtOH-AcOEt (MARIGO, 1973).

#### B.2. METODOS INDIRECTOS

BLOUIN y ZARINS (1988) desarrollaron un método para extraer polifenoles de semillas, en el que el desengrasado se lleva a cabo en dos etapas: la primera, con hexano; la segunda, con éter de petróleo. La extracción tiene lugar con EtOH al 70 %. En otros casos, sólo se realiza una fase de limpieza con éter de petróleo (ARAUJO LIMA y POLONSKY, 1973).

#### C. ACETONA

Está descrito el empleo de acetona pura para la extracción de polifenoles de semillas (JERUMANIS, 1985) y hojas (WOLLENWEBER, 1990; SCHILLING, 1988); así como de mezclas acetona-agua para hojas (MUELLER-HARVEY, 1987), flores (Patente de la Societé Civile d'Investigations Pharmacologiques d'Aquitaine, 1975) o semillas (MCMURROUGH, 1981).

WOLLENWEBER (1981) utiliza acetona-éter de petróleo para extraer compuestos fenólicos de hojas y ramas.

#### D. AGUA Y SOLUCIONES ACUOSAS ALCALINAS

##### D.1. Extracción de madera

ANTONOVSKII *et al.* (1977) y LYUBANSKII *et al.* (1981) utilizan agua para la extracción de flavonoides de madera, a distintas temperaturas y presiones.

##### D.2. Extracción de corteza

PARAJO *et al.* (1983) y VAZQUEZ *et al.* (1986) describen el empleo de soluciones acuosas alcalinas para la extracción de monómeros y polímeros de flavonoides.

##### D.3. Extracción de raíces

KATSURA y YAMAGISHI (1982) emplean una solución de NaOH al 70 % para la extracción de muestras de raíces en polvo.

##### D.4. Extracción de hojas

El empleo de agua ha sido descrito por RWANGABO *et al.* (1988) y STRACK (1978).

##### D.5. Extracción de pieles de cítricos

PARK *et al.* (1983) parten de pieles de limón molidas y desengrasadas que extraen con H<sub>2</sub>O templada, a pH próximo al pH natural de las pieles.

##### D.6. Extracción de partes aéreas de planta

BROWNING (1967) utiliza agua hirviente para la extracción de polifenoles.

#### E. OTROS DISOLVENTES MENOS FRECUENTES

- HEXANO. MARKHAM (1982) describe el empleo de este disolvente para la extracción de polifenoles poco polares. También lo utilizan CERECER *et al.* (1974), YATAGAI y

TAKAHASHI (1984) y FERRERES *et al.* (1986).

- THF. YUMIOKA (1986).

- BENCENO-MEOH. SHIN *et al.* (1982).

-  $\text{CHCl}_3$ . MUES, (1988); TOMAS-BARBERAN *et al.* (1988); ECHEVERII *et al.* (1985); BARBERAN *et al.* (1986).

-  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . CRINS *et al.* (1988).

- ETER DE PETROLEO. YAZAKI y HILLIS (1976); SCHAUFELBERGER y HOSTETTMANN (1988); OKSUZ *et al.* (1987).

- ACETATO DE ETILO.

- Sin desengrasado previo: MUES (1988)

- Con desengrasado previo: VERCRUYSE *et al.* (1985); MOUSTAFA *et al.* (1984).

Respecto a las condiciones de extracción (temperatura, relación sólido/disolvente, agitación, duración, etc.), es tal la variedad de posibilidades que aparecen en la bibliografía, que no es posible establecer ninguna condición como preferente. Lo mismo ocurre en lo referente al tratamiento previo de la muestra. La máxima variabilidad se ha encontrado en el caso de las hojas que unas veces se extraen en estado fresco; otras, secas; y otras, liofilizadas.

## 2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

### 2.1. MOLIENDA Y TAMIZADO

Para los ensayos previos de extracción, la madera y la corteza fueron troceadas, respectivamente, de forma mecánica y manual. Posteriormente, la madera fue sometida a un astillado de tipo cerilla, con un desfibrador de discos Sprout-Waldron,

equipado con un disco de púas, modelo C-2976-I. La textura de las fibras de corteza no permite la utilización de este desfibrador.

Las astillas de madera y los trozos de corteza se molieron con un molino Baumuller (Nunrberg), mod. D-Mat/ Typ ECZF, F230, con una placa de rejilla nº 3 (de 3 mm de diámetro de poro).

Para ciertos ensayos, las muestras molidas fueron tamizadas a través de tamices C.I.S.A., de luz: 0.75, 0.46, 0.35, 0.28, 0.24 m/m, con ayuda de un agitador de centrífuga.

Para los ensayos sistemáticos, las muestras de madera y corteza fueron troceadas mecánicamente y trituradas en el molino Baumuller, sin astillado previo. Sin embargo, las hojas fueron cortadas manualmente y molidas en un molino tipo "Turmix". En este caso, no se tamizaron las muestras, dada la escasa cantidad disponible de algunas de ellas.

## 2.2. DETERMINACION DE HUMEDAD

Como paso previo a la extracción, se determinó la humedad de todas las muestras, de acuerdo con la norma Tappi T 208 om-89:

Se pesan 10 g de muestra, en un matraz de 500 ml, se añaden 200 ml de xileno-tolueno (195:5), y se destila la mezcla durante 4 h. El destilado está formado por una mezcla gaseosa azeotrópica de xileno-tolueno y agua, que, al condensarse, se separa en dos fases, orgánica y acuosa, que se recogen en un recipiente graduado, situado entre el matraz y el refrigerante. La fase acuosa, más pesada, se sitúa debajo, y su volumen puede medirse directamente en ml con ayuda de la escala graduada. El porcentaje de humedad se calcula a partir de esta lectura, multiplicando por 10.

### 3. ENSAYOS PRELIMINARES DE EXTRACCION

Se ha seleccionado el metanol como disolvente de extracción, ya que es el utilizado con más frecuencia en la bibliografía, seguido por el etanol.

Los procedimientos de extracción, ensayados en primer lugar, se basaron, fundamentalmente, en los empleados por MARTINEZ (1980), BICK *et al.* (1972), ADZET (1988), COURTNEY *et al.* (1983), MARKHAM (1982), HILLIS *et al.* (1974), WOO (1979) y BOUKEF (1976). A partir de los métodos propuestos por estos autores, con ligeras modificaciones, elaboramos dos procedimientos. El primero de ellos se desarrolla en caliente, con una fase inicial de limpieza de grasas, ceras, clorofilas, etc., mediante extracción con un disolvente apolar, como el cloroformo o éter de petróleo, seguida de la etapa de extracción de compuestos fenólicos, con MeOH o mezclas de MeOH-H<sub>2</sub>O. De la solución de "desengrasado", se recuperan los compuestos fenólicos que pudiesen haber ido arrastrados, aplicando el método propuesto por COURTNEY *et al.* (1986). El segundo método consiste en una extracción, en frío, de las muestras sin tratar, con MeOH o mezclas de MeOH-H<sub>2</sub>O.

#### 3.1. EXTRACCION CON METANOL, EN CALIENTE, PRECEDIDA DE LIMPIEZA CON CHCl<sub>3</sub>

La figura IV.1 recoge el esquema de este método. Su característica más destacable es el tratamiento de extracción sucesiva con disolventes de polaridad creciente (éter etílico, acetato de etilo y butanol), a que se somete la fase acuosa I que se origina tras la eliminación del metanol. De esta manera, se pretende dividir el extracto en tres fracciones compuestas por: aglicones fenólicos (que pasarían a la fase etérea); aglicones muy polares y compuestos monoglicosilados (en la fase de acetato de etilo); y compuestos poliglicosilados (en la fase butanólica).

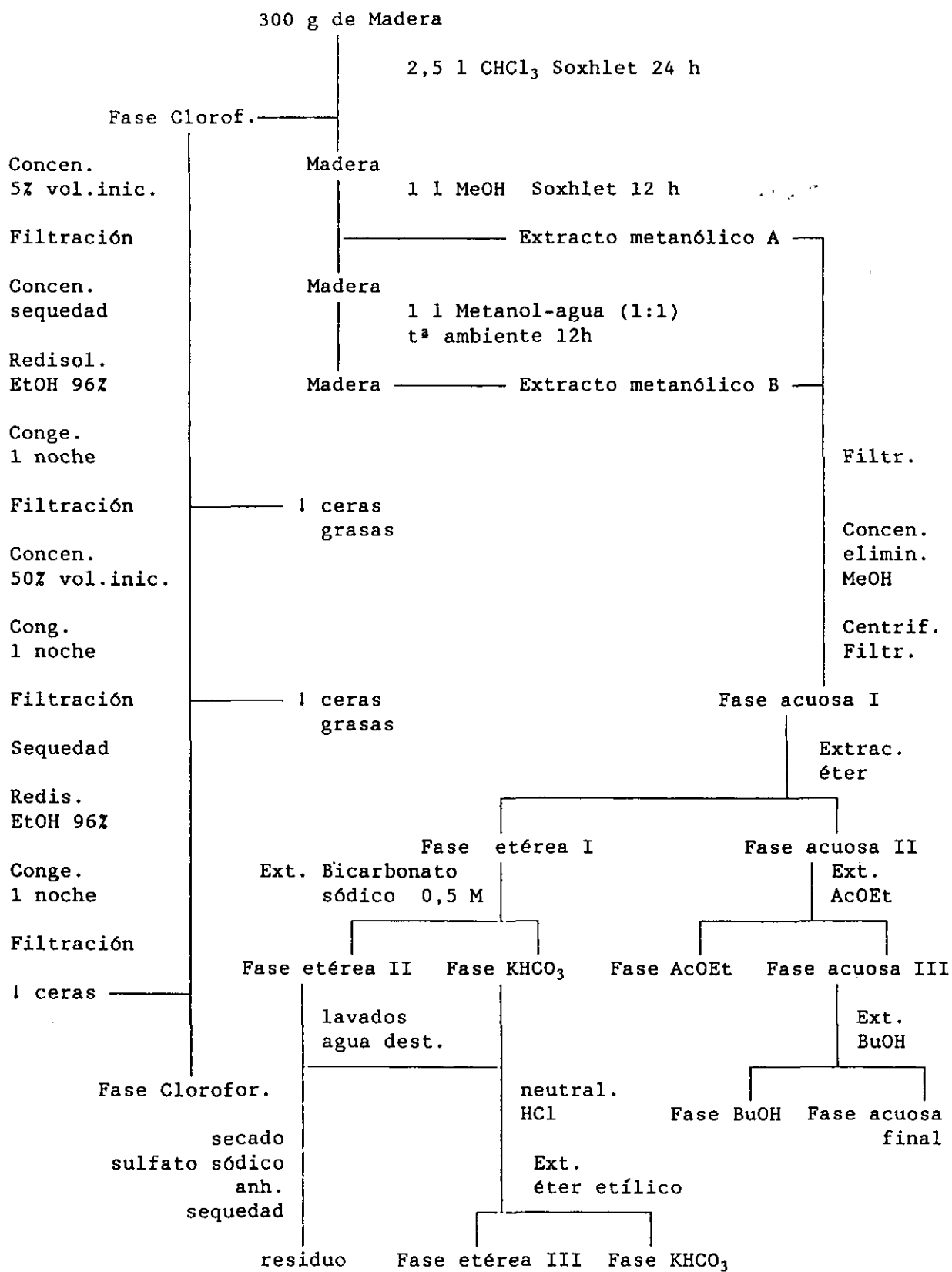


Figura IV.1.: Esquema de extracción, en caliente, con MeOH, con fase inicial de limpieza con  $\text{CHCl}_3$ .

Los rendimientos obtenidos en este tipo de ensayo, referidos a 100 g de madera seca, para las distintas fases del proceso de extracción, son:

Fracción	Rendimiento (%)
Fracción A+B	1,35
Fracción AcOEt a	0,22
Fracción AcOEt b	0,09
Fracción BuOH	0,38
Fracción etérea II	0,17
Fracción etérea III	0,05
Fracción acuosa final	0,41
Fracción clorofórmica	1,02

### 3.2. EXTRACCION, EN FRIO, CON METANOL

La figura IV.2 representa el esquema de este método. En este caso, el extracto metanólico concentrado se divide en dos fracciones, cada una de las cuales se somete a un proceso de limpieza mediante extracción con éter de petróleo y cloroformo, respectivamente. Por simplicidad, se han suprimido las etapas de tratamiento de las fases clorofórmicas y de éter de petróleo, por ser exactamente iguales a las representadas en el esquema del método anterior de extracción en caliente, con fase inicial de limpieza con  $\text{CHCl}_3$  (figura IV.1). El (\*) indica que la continuación del método sería igual que en el esquema anterior.

Las fases acuosas IVA y IVB, con un volumen mucho menor que en el método anterior, no se concentraron para evitar carbonizaciones o degradaciones.

Las fases etéreas A y B se someten al mismo tratamiento que en el método anterior, es decir, a una extracción con una solución de  $\text{KHCO}_3$  para separar los ácidos fenólicos del resto de los polifenoles.



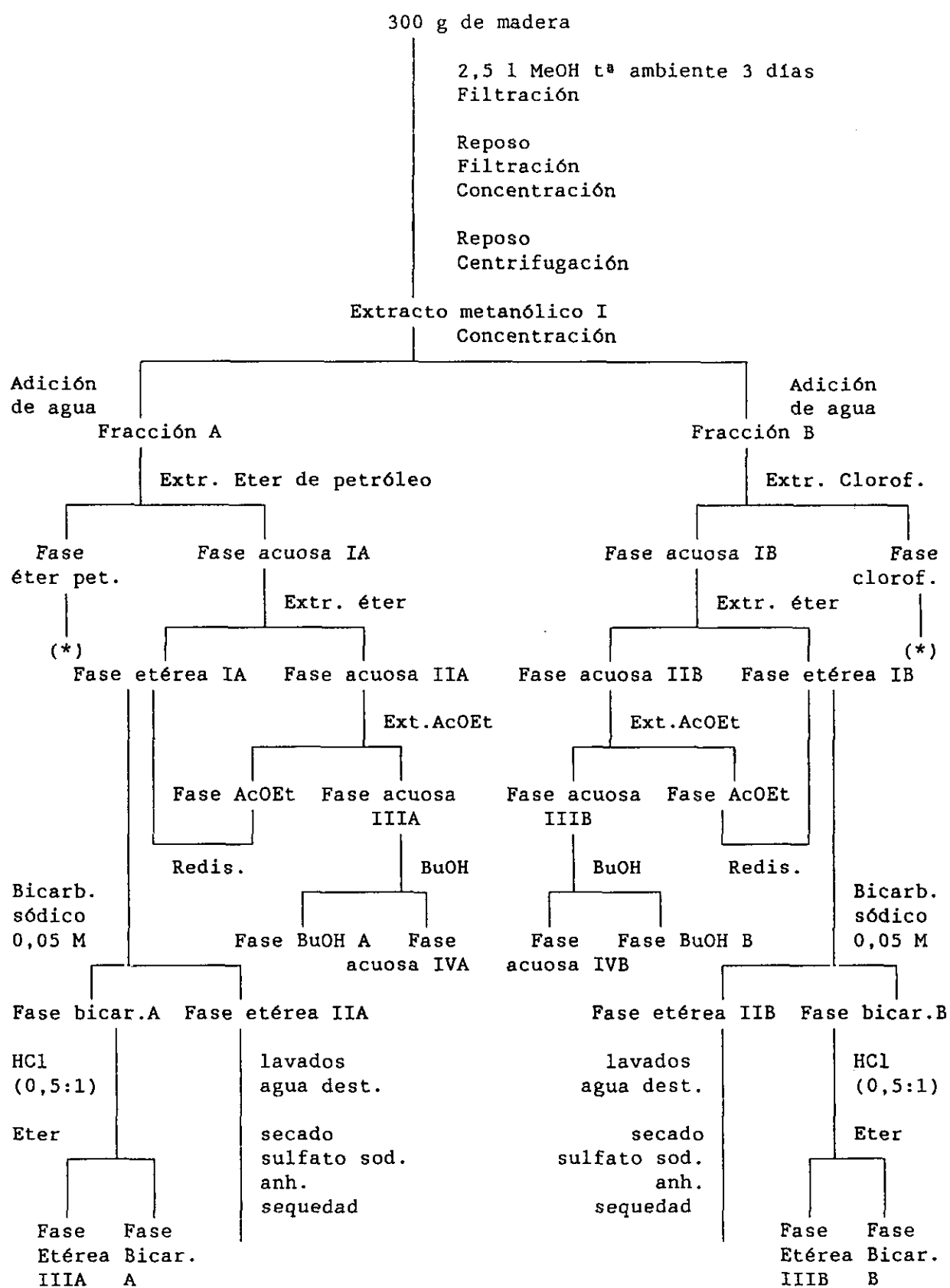


Figura IV.2: Esquema del método de extracción con MeOH, en frío.

Los rendimientos de extracción, referidos a 100 g de madera seca, se recogen a continuación:

Fracción	Rendimiento (%)
Fracción metanólica	0,97
Fracción éter petróleo A	0,15
Fracción clorofórmica B	0,25
Fracción AcOEt A	0,26
Fracción AcOEt B	0,15
Fracción BuOH A	0,14
Fracción BuOH B	0,08
Fracción éter IIA	0,06
Fracción éter IIB	0,01
Fracción éter IIIA	0,03
Fracción éter IIIB	0,07

### 3.3. EXTRACCIONES SIMPLIFICADAS

Dada la complejidad de los métodos anteriores, y las dificultades encontradas en las sucesivas extracciones con disolventes de polaridad creciente, debidas, fundamentalmente a las emulsiones que se formaban durante el proceso, se decidió ensayar un nuevo método de extracción, muy simplificado, cuyo esquema se expone en la figura IV.3.

El mayor contenido en compuestos fenólicos de la corteza y su mayor densidad, que se traduce en un volumen, por unidad de peso, prácticamente doble del de la madera, condicionaron el establecimiento del tamaño de las muestras de corteza, que fueron extraídas.

Los rendimientos de extracción de madera y corteza, obtenidos por este método, son:

MUESTRA	Extracto	Rendimiento (%)
MADERA	Extracto metanólico	1,60
	Extracto clorofórmico	0,27
CORTEZA	Extracto metanólico	7,88
	Extracto clorofórmico	0,26

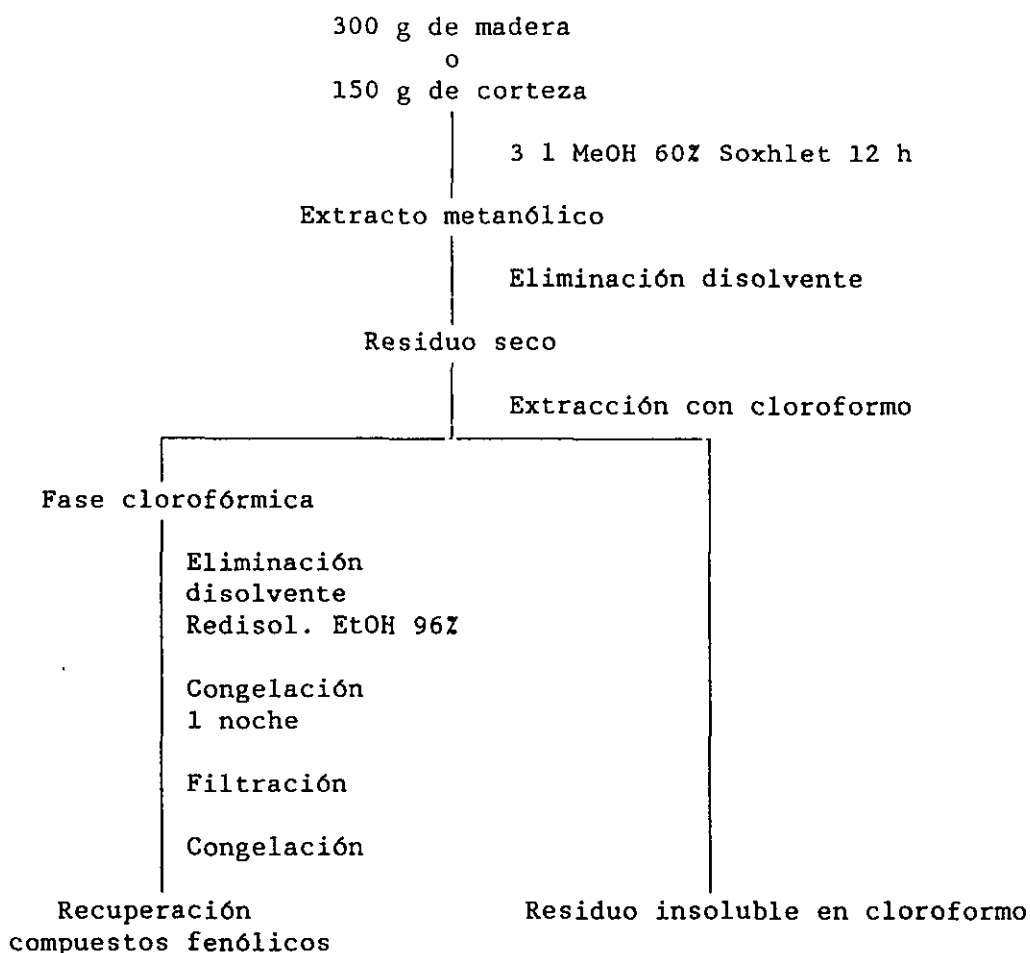


Figura IV.3: Esquema del método de extracción simplificado.

### 3.4. ENSAYOS SISTEMATICOS DE RENDIMIENTOS DE EXTRACCION.

En la bibliografía, existen muy pocos estudios sistemáticos sobre la influencia de las condiciones de extracción sobre el rendimiento y composición de los extractos. Podemos destacar los de JULKUNEN y TAHVANAINEN (1989) sobre la influencia del método de preparación de la muestra; y los de CAPEROS *et al.* (1990) y VAZQUEZ *et al.* (1986), sobre las distintas variables que intervienen en los procesos de extracción. Por ello, decidimos realizar una serie de ensayos sistemáticos de extracción de las muestras tipo de corteza y madera de *E. globulus*, en distintas condiciones de trabajo. Se pretendía realizar un análisis de la

influencia de tres variables: tiempo, tamaño de partícula y disolvente, sobre los rendimientos de extracción de las dos muestras tipo. Como disolventes de extracción, se emplearon mezclas de MeOH-H<sub>2</sub>O, en distintas proporciones, cuya utilización ya ha sido descrita para la obtención de polifenoles de madera y corteza (YAZAKI y HILLIS, 1976; HILLIS *et al.*, 1974); y de hojas (BOUKEF *et al.*, 1976; BICK *et al.*, 1972; YATAGAI y TAKAMASHI, 1984), de varias especies de *Eucalyptus*. Todas las extracciones se han realizaron en frío (a temperatura ambiente) y en caliente.

### 1. Condiciones de extracción

Se han extraído siempre 5 g de madera o corteza, con 300 ml de la mezcla de MeOH-H<sub>2</sub>O correspondiente.

Para las extracciones en caliente, se ha utilizado un extractor Soxhlet, formado por un matraz de 500 ml y un cuerpo extractor de 125 ml con cápsula interior, con placa filtrante del nº 1.

En las extracciones en frío, las suspensiones formadas por el disolvente y la materia vegetal se agitaron inicialmente, para conseguir un mejor contacto entre el sólido y el líquido, pero el resto del tiempo de extracción se mantuvieron en reposo. La separación del extracto y el sólido residual se realizó por filtración a vacío.

### 2. Elección de los valores de las variables estudiadas

Como hemos indicado anteriormente, se han realizado dos grupos de extracciones: con madera y con corteza. En ambos casos, se han estudiado, por separado, las condiciones de extracción en caliente y en frío. Para cada una de las variables, objeto de estudio, se trató de seleccionar tres valores, de forma que el central fuese la media aritmética de los de los extremos. Esta condición se pudo mantener con el tiempo de extracción, para el que se eligieron los valores de 4, 8 y 12 h; y con el disolvente,

para el que se seleccionaron mezclas de MeOH-H<sub>2</sub>O, con 40, 60 y 80 % de MeOH. Para el tamaño de partícula, no se pudieron encontrar tres valores que cumpliesen esta condición. Por ello, se han seleccionado las muestras que atraviesan el tamiz de luz L1 = 0,75 mm que son recogidas en el de L2 = 0,46 mm ( $t_p = 0,59$  mm); y las que atraviesan el tamiz de luz L1 = 0,35 mm que son recogidas en el tamiz de luz L2 = 0,28 mm ( $t_p = 0,31$ ). El tamaño de partícula  $t_p$  se ha calculado por la fórmula:

$$t_p = \sqrt{L1 \times L2}$$

Los niveles se recogen en la siguiente tabla:

Composición del disolvente (% MeOH)	40	60	80
Tiempo de extracción (h)	4	8	12
Tamaño de partículas (mm)	0,31		0,59

### 3. Determinación del rendimiento de extracción

Después de eliminar el disolvente de cada extracto por destilación a vacío, se determina el rendimiento de extracción como porcentaje en peso del residuo seco de extracto, referido a muestra seca de partida.

Los resultados de los rendimientos de extracción se reúnen en las tablas IV.1 y IV.2:

Tabla IV.1: Rendimientos de ensayos sistemáticos de extracción de madera.							
Tamaño part.(mm)		0,59			0,31		
Z MeOH		40	60	80	40	60	80
En Frío	t(h)						
	4	0,795	0,844	0,983	1,040	1,182	1,096
	8	0,907	1,042	1,031	1,062	1,223	1,122
	12	1,006	1,073	1,172	1,062	1,254	1,137
En Caliente	t(h)						
	4	1,810	1,639	1,482	2,206	1,843	1,843
	8	1,964	1,772	1,593	2,324	1,993	1,847
	12	2,111	1,999	1,696	2,389	2,030	1,853

Tabla IV.2: Rendimientos de ensayos sistemáticos de extracción de corteza							
Tamaño part.		0,59			0,31		
Z MeOH		40	60	80	40	60	80
En Frío	t(h)						
	4	6,721	6,621	5,813	5,993	6,073	5,913
	8	6,776	7,239	6,445	6,236	6,526	5,928
	12	7,039	7,442	7,297	6,904	6,582	6,110
En Caliente	t(h)						
	4	9,397	8,571	8,002	8,439	7,132	6,913
	8	10,010	9,026	8,515	8,458	7,582	7,304
	12	10,454	9,147	8,619	8,902	8,491	7,595

Del análisis de estos resultados, puede deducirse que:

a) Tanto en madera, como en corteza, las extracciones en caliente permiten obtener mayores rendimientos que las que se realizaron en frío.

b) En frío, el comportamiento es complejo. Al analizar

conjuntamente tiempo y tamaño de partículas, se observa que no se produce gran aumento del rendimiento extractivo al disminuir el tamaño de partículas; incluso, en el caso de corteza cuya contextura es más fibrosa, el rendimiento es menor al disminuir el tamaño de partículas. Esto hace pensar que los fenómenos de sedimentación que se producen en ausencia de agitación, pueden dificultar el contacto sólido-líquido y reducir el rendimiento de extracción.

Para confirmar esta conclusión, se realizaron una serie de ensayos de extracción en frío a 12 h, empleando un tamaño de partículas todavía menor, que corresponde a la materia que atraviesa el tamiz de luz 0,24 mm, y que llamamos "harina" de madera o corteza. En este caso, la suspensión se agitó esporádicamente para evitar el problema de sedimentación. Los resultados obtenidos son:

% MeOH	40	60	80
Madera	1,849	2,113	1,981
Corteza	7,477	8,088	8,455

Este aumento de los rendimientos confirma la tendencia esperada de acuerdo con el aumento de la superficie de contacto sólido/líquido, al disminuir el tamaño de las partículas, siempre que una suficiente agitación elimine los problemas ocasionados por los fenómenos de sedimentación.

En cuanto al efecto de la polaridad del disolvente (diferentes proporciones de MeOH-H<sub>2</sub>O) en la extracción, se observa un mayor rendimiento de extracción con disolventes de polaridad media, tanto en corteza como en madera, a excepción de la muestra de madera de tamaño de partícula 0,59 mm.

c) En caliente, no obstante, las tendencias están completamente definidas. En todos los casos, el rendimiento disminuye al aumentar el porcentaje de MeOH. Esto hace pensar que al calentar estamos aumentando la solubilidad de

ciertos grupos de componentes muy polares, como pueden ser celulosa y taninos, los cuales contribuyen al peso de extracto, pero carecen de interés para nuestro estudio.

De estos ensayos, se derivan una serie de consideraciones:

1) Aunque los rendimientos de extracción son más altos en caliente, es posible que el calentamiento provoque degradaciones, o afecte a la estabilidad de los compuestos polifenólicos que se pretende extraer.

2) El hecho de que los rendimientos de extracción, en caliente sean mayores para el porcentaje de 40 % de MeOH, no implica que se obtenga una mayor concentración de los componentes polifenólicos de interés, que son más solubles en MeOH que en H<sub>2</sub>O. Cabe pensar que el empleo de MeOH al 80 % permitiría una extracción selectiva de polifenoles frente a otros tipos de compuestos más polares y, a la vez, mayoritarios en la materia vegetal de partida.

3) No se puede sacar una conclusión definitiva respecto al tamaño de partículas, aunque quizá sea conveniente trabajar con los tamaños más pequeños posible.

Con el fin de determinar el contenido polifenólico de los extractos obtenidos con los distintos procedimientos, se realizan nuevas extracciones en frío y caliente, a 12 y 24 h, respectivamente, con proporciones de MeOH de 40 % y 80 %, de acuerdo con el esquema de la figura IV.4:



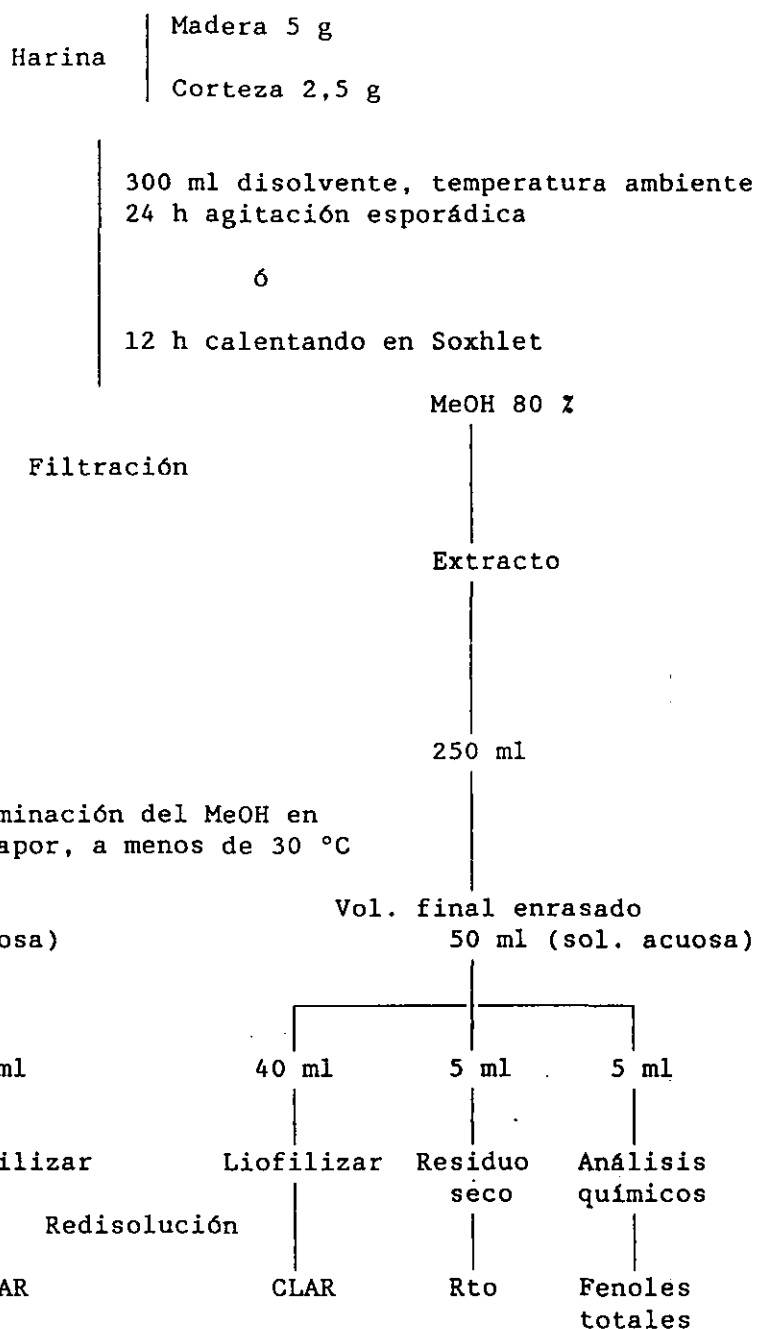


Figura IV.4: Esquema de extracción en frío y en caliente, para valorar el rendimiento polifenólico.

En estos nuevos métodos, se han introducido unas modificaciones con las que se pretende:

- Uniformizar los ensayos, para facilitar el cálculo de los

rendimientos, tomando 250 ml de solución filtrada de la que se elimina el MeOH, por destilación a vacío.

- De la solución acuosa resultante, se toma una fracción, para determinar el rendimiento de extracción.

- Otra fracción se utiliza para la aplicación del método de Folin-Ciocalteu, de determinación de fenoles totales.

- El resto se somete a liofilización, para facilitar su conservación hasta su análisis por CLAR. La necesidad de eliminar el disolvente orgánico, como paso previo a la liofilización, obliga a concentrar hasta volúmenes diferentes los dos extractos: hasta 150 ml, el extracto de MeOH al 40 %; y hasta 50 ml, el de MeOH al 80 %.

Para valorar el contenido polifenólico de estos extractos se aplicaron los métodos siguientes:

#### I. Método de determinación de fenoles totales de Folin-Ciocalteu

Se aplicará el método de valoración de fenoles totales de Folin-Ciocalteu, tal como se describe en el apartado de valoración cuantitativa (ver apartado VIII.1.1.).

#### II. Análisis por CLAR de los extractos

Una pequeña porción del liofilizado, obtenido con estas extracciones, se analiza por CLAR, como se describe en el apartado correspondiente (ver apartado VI.4.3.).

Se valora también el efecto de distintos disolventes utilizados en la redisolución del liofilizado: MeOH o MeOH al 80 %. Asimismo, se estudia la posibilidad de obtener la fracción polifenólica, por extracción del liofilizado con éter etílico, para eliminar el problema de emulsiones en las

extracciones líquido-líquido.

Los rendimientos obtenidos en las nuevas extracciones y los contenidos de fenoles totales de los extractos, se reúnen en la tabla IV.3:

Tabla IV.3: Resultados de los ensayos de extracción para la determinación de la relación rendimiento/contenido polifenólico.						
Muestra	Temperat.	% MeOH	t(h)	Rend.% total	Rend.% liof.	Fenoles tot.*
Madera	Frío	40	24	4,926	3,374	6,1
	Caliente	40	12	3,125	2,528	9,4
	Frío	80	24	2,248	2,875	7,3
	Caliente	80	12	2,871	2,865	7,6
Corteza	Frío	40	24	10,787	9,281	29,3
	Caliente	40	12	12,402	13,139	40,7
	Frío	80	24	9,651	11,729	27,3
	Caliente	80	12	9,095	10,563	24,1

(\*) El contenido en fenoles totales está indicado en mg/g de materia seca, calculados en quercetina.

Analizando estos resultados, se comprueba que un mayor rendimiento extractivo no tiene por qué coincidir con un mayor contenido polifenólico. Esto es evidente en el caso de la madera. En la corteza, los compuestos cuya solubilidad aumenta al extraerse con MeOH 40%, y que contribuyen a un mayor contenido en fenoles totales, deben ser taninos y, por lo tanto, polifenoles de alto peso molecular, que no son objeto de este estudio.

En cuanto a los resultados de los análisis de los extractos por CLAR, se puede concluir que:

- Respecto a la composición de los extractos, en frío y en caliente, no se observan diferencias en el caso de madera,

mientras en corteza hay variación de la altura relativa de los picos, correspondientes a los distintos componentes, en ambos tipos de extracto. En el extracto en caliente, se aprecia una degradación de los elagitaninos, cuyos picos se reducen considerablemente, mientras el pico del ácido elágico experimenta un fuerte aumento.

- No existen diferencias entre los extractos en MeOH al 40 % o al 80 %, ni en madera ni en corteza.

- La redisolución del liofilizado de corteza, en MeOH al 80 %, parece aumentar la concentración de compuestos con un máximo de absorción a 280 nm (fundamentalmente proantocianidinas), con respecto a la redisolución en MeOH al 40 %. Sin embargo, no se observan diferencias en el caso de madera.

- La extracción con éter del liofilizado no da buen resultado, pues, con ella, se consigue un proceso de redisolución de la muestra total y, en ningún modo, una extracción selectiva.

Tras el análisis de los resultados en el estudio comparativo de los distintos métodos de extracción, consideramos conveniente seleccionar las siguientes condiciones:

- 1) Extracción en frío: dado que nuestro interés se centra más en preservar la estabilidad de los polifenoles que se pretende extraer, para permitir su posterior identificación, que en aumentar el rendimiento extractivo, lo cual facilitaría alguna alteración de la estructura química de los compuestos de interés.

- 2) Utilización del disolvente MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20): para facilitar la extracción selectiva de los compuestos polifenólicos frente a los componentes mayoritarios (hidratos de carbono, taninos) en cada material vegetal.

3) Selección de tamaño de partícula: más pequeño posible, con el fin de aumentar la superficie de contacto sólido/líquido.

4) Adición de un paso de extracción líquido-líquido con éter: dado el carácter de componentes minoritarios que presentan los polifenoles monoméricos, objeto del estudio, en la madera, corteza y hojas, consideramos conveniente realizar un paso de extracción con éter, con la intención de obtener una fracción etérea rica en dichos componentes. El mal resultado conseguido en la extracción directa sobre el liofilizado, determina la necesidad de realizar la extracción líquido-líquido, pese a los inconvenientes de las emulsiones.

### 3.5. METODO DEFINITIVO DE EXTRACCION

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, el método de extracción definitivo seleccionado, es el recogido en la figura IV.5. Cabe comentar que:

- En la extracción de hojas, durante el proceso de concentración, aparece un precipitado (posiblemente ceras, clorofilas y grasas) que se separa por filtración, antes de la extracción con éter. El análisis de este precipitado demuestra la ausencia de polifenoles y, por eso, no se toma en consideración.

- En algunos casos, la extracción con éter etílico generaba unas fuertes emulsiones. La adición de NaCl facilitó su eliminación, pero, al disolverse en la fase acuosa, imposibilitó el cálculo del porcentaje de liofilizado.

El estudio, objeto de la Tesis, se centra en el análisis de las fases etéreas, en las que se encuentran la casi totalidad de los polifenoles de bajo peso molecular.

MADERA (10 g)

CORTEZA (5 g)

HOJAS (10 g)

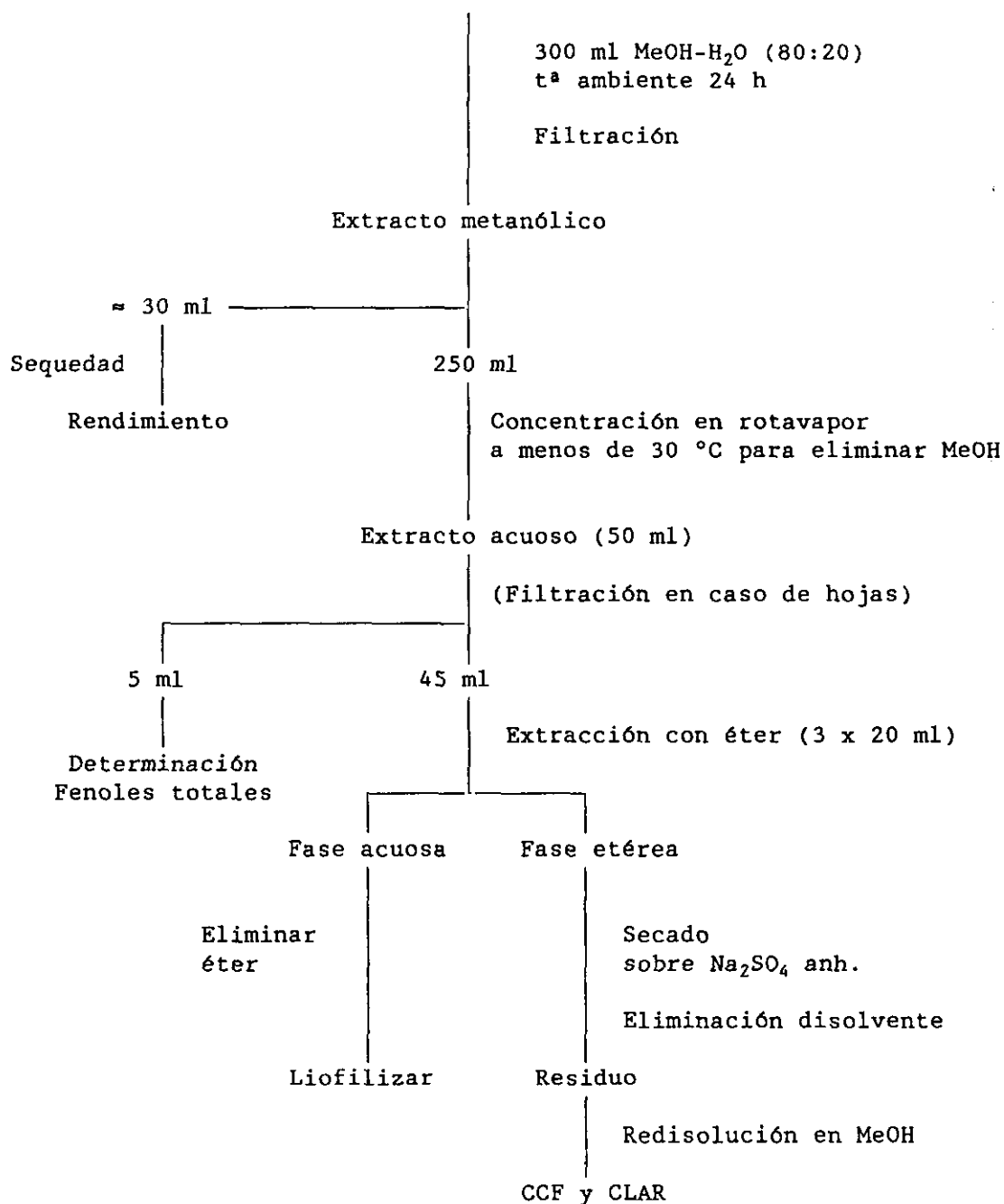


Figura IV.5: Esquema definitivo de extracción

**V. ANALISIS DE COMPUESTOS FENOLICOS POR  
CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA**

## V. ANALISIS DE COMPUESTOS FENOLICOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

### 1. INTRODUCCION

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica analítica, ya largamente utilizada para el análisis de compuestos fenólicos. Existen muchos trabajos generales sobre esta técnica (RANDERATH, 1965; STAHL, 1969; TOUCHSTONE y DOBBINS, 1978; KIRCHNER, 1978) y algunos específicos, referidos a su aplicación al estudio de compuestos fenólicos (MARKHAM, 1975; RIBEREAU-GAYON, 1969).

La CCF es un procedimiento más sensible que la cromatografía en papel (de 10 a 100 veces, según los casos), por lo que permite realizar análisis con menores cantidades de muestra. Presenta también la ventaja de posibilitar el empleo de gran cantidad de soportes y de sistemas eluyentes, así como de un desarrollo mucho más rápido. Presenta, por el contrario, como desventaja, la dificultad de reproducir los valores de  $R_f$  por la variabilidad de condiciones ambientales.

Es especialmente útil en las siguientes aplicaciones:

- La separación e identificación de compuestos fenólicos, mediante el empleo de distintos eluyentes y reveladores, y su comparación con el comportamiento de patrones. No obstante, las conclusiones que se obtienen con esta técnica, no pueden considerarse como definitivas, sino simplemente como apoyo a otras técnicas.
- Aislamiento de compuestos fenólicos.
- Seguimiento de fraccionamientos por cromatografía en columna, así como de reacciones de hidrólisis o de metilación.



Los soportes más utilizados son la celulosa, la sílice y las poliamidas. La diversidad de eluyentes aplicables es muy grande, pudiendo seleccionar, en cada caso, el más adecuado para el grupo de compuestos a separar. Al igual que la cromatografía en papel, esta técnica admite desarrollos mono y bidimensionales.

La observación de las manchas en la placa cromatográfica puede hacerse, según la naturaleza de los compuestos estudiados, directamente a la luz visible, bajo luz ultravioleta (UV) o, en ambos casos, tras el empleo de un revelador.

## 2. APLICACION AL ESTUDIO DE COMPUESTOS FENOLICOS. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

### 2.1. SOPORTES

Como ya indicamos, son tres los tipos de soporte más ampliamente utilizados para el análisis por CCF. A continuación se describen con cierto detalle.

#### 2.1.1. Gel de sílice

Existen diversos tipos de gel de sílice, comercializados con o sin indicador de fluorescencia. Entre ellos, los más frecuentemente utilizados son la gel de sílice G y la gel de sílice G60 F<sub>254</sub>.

Es, quizá, el soporte para el que están descritos una mayor variedad de eluyentes. Entre ellos, cabe destacar los siguientes:

- Mezclas de CHCl<sub>3</sub> y MeOH, con H<sub>2</sub>O o ácidos (MARKHAM, 1982; MARTINEZ, 1980; ADZET *et al.*, 1988; MARUHENDA y ALARCON DE CASTRA, 1987; SCHAUFELBERGER y HOSTETTMANN, 1988; MARKHAM *et al.*, 1990); o con otros disolventes: CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO-HCO<sub>2</sub>H (9:2:1) (MUES, 1988); CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-HCO<sub>2</sub>H (7:4:1) (BICK *et al.*, 1972).

- Mezclas de AcOEt con H<sub>2</sub>O, ácidos o MEC (metiletilcetona) (SCHAUFELBERGER y HOSTETTMANN, 1988; FICARRA *et al.*, 1984; MUES, 1988; SACHSE, 1988; HEIMLER *et al.*, 1990).

- Acido acético con metanol y agua (HEIMLER, 1986).

- Mezclas en las que el tolueno es el componente mayoritario: con cloroformo y acetona (SACHSE, 1988); con cloroformo-acetona-ácido fórmico (VERCRUYSSSE *et al.*, 1985); con acetona-ácido fórmico (LEA *et al.*, 1979); con ácido fórmico y acetato de etilo (MARTINEZ, 1990); con ácido fórmico y formiato de etilo (MUES, 1988); con AcOH o dioxano y AcOH (TOMAS BARBERAN *et al.*, 1988).

- Mezclas donde el benceno es el componente mayoritario: con piridina y ácido fórmico (MUES, 1988; MARTINEZ, 1980); con AcOEt (GHOSH *et al.*, 1987); con AcOEt y acetona (ECHEVERRI *et al.*, 1985); con AcOEt-AcOH (TOMIMORI *et al.*, 1984).

- n-AcOBu-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O (MARGHIERI, 1980).

### 2.1.2. Celulosa

Su empleo ha evolucionado considerablemente, gracias al desarrollo de celulosas microcristalinas. Se han utilizado tanto para desarrollos monodimensionales, como bidimensionales.

#### a) Desarrollos monodimensionales

Los eluyentes más utilizados son las mezclas de butanol-ácido acético-agua, en diversas proporciones (MARKHAM, 1982; MUES, 1988; SACHSE, 1988; VAN GENDEREN *et al.*, 1983), y ácido acético más agua (MARKHAM, 1982; MARUHENDA y ALARCON DE CASTRA, 1987; MUES, 1988; ADZET *et al.*, 1988; WEISSENBOCK *et al.*, 1987). También son citados frecuentemente los eluyentes constituidos por CHCl<sub>3</sub>-AcOH-H<sub>2</sub>O (SACHSE, 1988; MARKHAM, 1982; WEISSENBOCK *et al.*, 1987), por isopropanol-amoniaco-agua (GOMEZ-CORDOVES *et al.*,

1978), y por KCl al 20 % en H<sub>2</sub>O (FERNANDEZ DE SIMON, 1990).

### b) Desarrollos bidimensionales

Están citados los siguientes eluyentes:

1ª Dimensión	2ª Dimensión	Referencia
AcOH glacial - H <sub>2</sub> O (2:98)	BuOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (60:15:25)	MUELLER-HARVEY <i>et al.</i> (1987)
Alcohol isoamílico- AcOH-H <sub>2</sub> O (2:1:1)	AcOH-H <sub>2</sub> O (6:94)	MC.MURROUGH (1981)
Alcohol isoamílico- AcOH-H <sub>2</sub> O (2:1:1)	AcOH 2 %	LEA <i>et al.</i> (1979)
tBuOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (3:1:1)	AcOH 15 %	MUES (1988)
tBuOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (5:4:1) fase superior	HCO <sub>2</sub> H 5 %	SCHMID (1978)
AcOH 30 %	AcOH 60 %	MARTINEZ (1980)
HCO <sub>2</sub> H 2 %	Alcohol n-amílico- AcOH-H <sub>2</sub> O (10:6:5)	OZSMIANSKI (1984)
AcOH 1 %	CHCl <sub>3</sub> -AcOH-H <sub>2</sub> O (2:1:1)	BAILLY y RABOANARY (1984)
nBuOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (4:1:5) fase superior	AcOH 30 %	ADZET <i>et al.</i> (1988) RANDERATH (1962) MARKHAM (1982)

### 2.1.3. Poliamida

Se ha descrito la utilización de mezclas de:

- MeOH-H<sub>2</sub>O-AcOH (MARKHAM, 1982; HARBORNE, 1985).
- H<sub>2</sub>O-MEC-EtOH-acetilacetona (MARTINEZ, 1980), o H<sub>2</sub>O-MEC-MeOH-acetilacetona (MUES, 1988; MARKHAM, 1982).

- AcOEt-MEC-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O (MUES, 1988).
- Tolueno-MeOH-MEC-acetilacetona (SCHILLING y PANERO, 1988; MUES, 1988).
- Mezclas de benceno y tolueno con éter de petróleo, MEC o MeOH (WOLLENWEBER y KOHORST, 1988; MUES, 1988).

## 2.2. REVELADORES

Ciertos compuestos fenólicos pueden ser observados directamente en las placas, puesto que presentan coloración a la luz visible. Entre ellos, destacan las antocianidinas y antocianinas, las auronas y las chalconas.

Por otra parte, muchos de ellos desarrollan coloraciones variables bajo luz UV, tanto luz de Wood (366 nm), como de longitud de onda corta (254 nm), en la cual algunos son fluorescentes. Los fenómenos de fluorescencia se intensifican si la observación se realiza a baja temperatura, en N<sub>2</sub> líquido. Por ejemplo, algunos ácidos benzoicos que no son visibles a la luz UV a temperatura ambiente, presentan una fuerte fluorescencia azul si se sumergen los cromatogramas en N<sub>2</sub> líquido (RIBEREAU-GAYON, 1969).

No obstante, a pesar de esta posibilidad de observación con luz UV, en muchos casos es necesaria la utilización de reveladores, porque incrementan la sensibilidad en la detección de las manchas, cuando las muestras están poco concentradas o cuando se buscan compuestos minoritarios o no fluorescentes. También pueden aportar información sobre la estructura de los compuestos.

Los reveladores de los compuestos fenólicos, objeto de este estudio, se pueden clasificar en:

## I. Ionizantes:

- Amoníaco. Si se aplican vapores de amoníaco sobre la mancha, se producen cambios en la fluorescencia, que pueden ser observados bajo luz UV de 254 ó 366 nm (MUES, 1988; MABRY *et al.*, 1970; MARTINEZ, 1980).

- Carbonato sódico. Se trata de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10 %, en  $\text{H}_2\text{O}$ , aplicable en gota o mediante pulverización. La observación se efectúa a la luz visible y con luz UV.

## II. Quelantes:

- Reactivo A de productos naturales, de Neu: Solución metanólica del éster  $\beta$ -aminoetílico del ácido difenilbórico. La pulverización de la placa, con este reactivo, conduce a la formación de complejos irreversibles con flavonas y flavonoles (NEU, 1957; MUES, 1988). En algunos casos, se recomienda una segunda pulverización con una disolución metanólica de polietilenglicol (MARTINEZ, 1980).

-  $\text{AlCl}_3$ . Se utilizan soluciones de  $\text{AlCl}_3$  en agua (MARKHAM, 1982), o en MeOH (MARTINEZ, 1980). La observación de la placa, después de aplicar el revelador, se puede realizar con luz UV o visible.

- Acetato básico de plomo. Este reactivo está especialmente recomendado para los ácidos cinámicos y los aldehídos fenólicos (GOMEZ-CORDOVES *et al.*, 1978). La observación de las coloraciones, obtenidas con este reactivo, se realiza a la luz UV.

-  $\text{FeCl}_3$  en EtOH (RIEBEREAU-GAYON, 1968; ECHEVERRI *et al.*, 1985; ABD-ALLA *et al.*, 1980).

### III. Oxidantes:

- FeCl<sub>3</sub>-K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Esta mezcla origina una coloración azul con todas las sustancias fenólicas.

### IV. Reveladores basados en reacciones de copulación con sales de diazonio:

- p-Nitroanilina diazotada, con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 15 %. Está recomendada para ácidos fenólicos (JANGAARD, 1970; ALIBERT, 1973).
- Acido sulfanílico diazotado (MARKHAM, 1982). Reacciona con compuestos que presentan grupos hidroxilo fenólicos libres, dando manchas amarillas, naranjas o rojas.

### V. Reveladores basados en reacciones de condensación con aldehídos:

- Vainillina clorhídrica (MUELLER-HARVEY *et al.*, 1987; MARKHAM, 1982) o sulfúrica (GARCIA-VALLEJO, 1973). Son reveladores generales de productos naturales, que se utilizan también como reveladores de fenoles, siendo la primera más específica de catequinas y proantocianidinas (flavanonas y dihidroflavonoles reaccionan más lentamente).
- Catequina en acetona/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se emplea como reactivo revelador de aldehídos (VILLECHENOUSE *et al.*, 1976).

### VI. Otros:

- Reactivo de Benedict. Está formado por dos soluciones acuosas, una de citrato sódico y carbonato sódico y otra de sulfato de cobre. Colorea de amarillo las manchas de flavonoides (MUES, 1988; ABD-ALLA *et al.*, 1980).

- 2,3-dibromoquinona clorimina. Reacciona con fenoles, originando coloraciones azul-verdosas (RIBEREAU-GAYON, 1968; GARCIA-VALLEJO, 1973).

- NaBH<sub>4</sub>/HCl y Zn/HCl. Se usan para la detección de flavanonas y dihidroflavonoles, respectivamente (ABD-ALLA et al., 1980). La mezcla Mg/HCl (Test Shinoda) reacciona también con ambos grupos, dando coloración rojo oscuro (MARKHAM, 1982).

### 3. APLICACION DE CCF AL ANALISIS DE COMPUESTOS FENOLICOS DEL GENERO *EUCALYPTUS*. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

El soporte más frecuentemente descrito en los trabajos sobre polifenoles, en el género *Eucalyptus*, es la gel de sílice. Sobre ella, se han utilizado los siguientes sistemas de desarrollo y reveladores:

- Benceno-AcOEt-Acetona (7:1:1), revelando con vapor de I<sub>2</sub> o con FeCl<sub>3</sub> etanólico (ECHEVERRI et al., 1985). Se utilizó para el aislamiento de flavanonas y dihidroflavonoles de *Eucalyptus* enfermos.

- CHCl<sub>3</sub>-EtOAc-HCO<sub>2</sub>H (5:4:1): para el fraccionamiento de extractos de madera de *E. sideroxylon* (HILLIS et al., 1974).

- CHCl<sub>3</sub>-EtOAc-HCO<sub>2</sub>H (7:4:1) o MeOH-CHCl<sub>3</sub>-éter de petróleo (2:4:7), y revelado con p-nitroanilina diazotada y SbCl<sub>3</sub> en CHCl<sub>3</sub>: para la separación de flavanonas de *E. sieberi* (BICK et al., 1972).

- Eter-cloroformo (2:3), revelado con Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> al 2 %, en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 %: para la identificación de eucaliptina en las hojas de *E. citriodora* (CERECER et al., 1974).

- Tolueno-MEC (9:1), revelando con Reactivo A de Neu (WOLLENWEBER y KOHORST, 1981).

Está también descrito el uso de poliamida con:

- Tolueno-éter de petróleo (100-140 °C)-metilcetona-MeOH (30:90:12:1,5) ó (60:30:15:5); tolueno-dioxano-MeOH (80:10:10), revelado con el reactivo A de Neu.

#### 4. METODOLOGIA

##### 4.1. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE FLAVONOIDES

###### 4.1.1. Ensayos preliminares

Para la puesta a punto del método de CCF, se utilizaron patrones de flavonoides, seleccionados por su presencia en diversas especies del género *Eucalyptus*:

- Encontrados en hojas del género *Eucalyptus*: crisina (WOLLENWEBER y KOHORST, 1981); quercetina, hiperósido, rutina (BOUKEF *et al.*, 1976); isoquercitrina, quercitrina (BOUKEF *et al.*, 1976; ABD-ALLA *et al.*, 1980); pelargonidina, cianidina, delfinidina (SHARMA y CROWDEN, 1974); luteolín-7-glucósido (ABD-ALLA *et al.*, 1980); pinocembrina (BICK *et al.*, 1972); cianidín-3-galactósido, cianidín-3-rutinósido, cianina, kuromanina (ABD-ALLA *et al.*, 1980).
- Encontrados en cortezas del género *Eucalyptus*: cianidín-3-galactósido, cianidín-3-rutinósido, cianina, kuromanina (ABD-ALLA *et al.*, 1980; ECHEVERRI *et al.*, 1985).
- Encontrados en maderas del género *Eucalyptus*: catequina (YAZAKI y HILLIS, 1976; HILLIS *et al.*, 1974).
- Encontrados en kinos del género *Eucalyptus*: naringenina (ABD-ALLA *et al.*, 1980; ECHEVERRI *et al.*, 1985).

Está descrita la presencia de glicósidos de kaempferol,



apigenina, miricetina y luteolina en hojas del género *Eucalyptus* (ABD-ALLA et al., 1980). Sin embargo, estos compuestos no están disponibles comercialmente; por ello, hemos ensayado sus correspondientes aglicones, que podrían obtenerse por hidrólisis de estos glicósidos, presentes en los extractos naturales. Para completar la información relativa al grupo de flavonoles, hemos incorporado también kaempferol-7-neohesperidósido y fisetina, de los que existen patrones comerciales.

Dado que flavanonas, dihidroflavonoles y proantocianidinas son los flavonoides mayoritarios en madera y corteza (WOLLENWEBER y DIETZ, 1981), dentro de este estudio hemos incrementado el número de compuestos de estos grupos, incluyendo hesperetina, hesperidina, naringina y eriodictyol, comprendidos en el grupo de las flavanonas; taxifolina, como dihidroflavonol, y epicatequina como precursor de las proantocianidinas.

La presencia de C-metil-flavonas, poco frecuentes (y no disponibles comercialmente) en el género *Eucalyptus* (CERECER y SANTOS, 1974; COURTNEY et al., 1983), nos indujo a estudiar el comportamiento de la vitexina, una C-glicosil-flavona, con el fin de determinar si el enlace C-C produce algún efecto especial en la separación cromatográfica.

Por último, hemos utilizado flavona y flavanona para deducir el comportamiento del esqueleto molecular de los flavonoides.

Todos estos patrones (ver Apéndice I de nomenclatura I.U.P.A.C. y de la procedencias de patrones comerciales) se prepararon disolviendo 2 mg en un ml de MeOH.

Puesto que nuestro interés en la CCF se centra en su aplicación como técnica de apoyo para las identificaciones, hemos prestado especial atención a las relaciones estructura/ $R_f$  y estructura/color. Existen trabajos previos sobre relaciones estructura/ $R_f$ , que utilizan distintos soportes: poliamida (WOLLENWEBER, 1982), gel de sílice (MARTINEZ, 1980) y sílice

modificada (HEIMLER, 1986). No obstante, no son estudios generales, sino que se refieren a grupos limitados de flavonoides, no representativos de todas las variedades funcionales. La información relativa a las relaciones estructura/color es muy escasa.

En este trabajo de puesta a punto, se han utilizado las siguientes condiciones:

1) Placas de CCF. Se prepararon, en nuestro laboratorio, placas de 20 x 20 cm, con un espesor de capa de 0,25 mm, de los siguientes tipos:

- Placas de gel de sílice. Se mezclaron 25 g de Kieselgel G60PF<sub>254-366</sub> (Merck) con 80 ml de agua destilada. Después de extender el adsorbente sobre la placa, ésta se deseca en estufa a 110 °C durante 15-20 min.
- Placas de celulosa. Se mezclaron 15 g de Sigmacell microcristalina, tipo 20, de tamaño de partícula 20 µm (Merck), con 60 ml de agua destilada y 0,2 g de indicador de fluorescencia F<sub>254</sub> para CCF Merck. Las placas se desecan en estufa, a 110 °C.

Se utilizaron cubetas Camag tipo estándar.

2) Eluyentes y desarrollos. Se emplearon diferentes sistemas eluyentes, dependiendo del soporte:

- Para placas de sílice, se utilizaron dos mezclas eluyentes: CHCl<sub>3</sub>-MeOH (93:7) (ADZET et al., 1988) y acetato de etilo-MEC-ácido fórmico-agua (50:30:10:10) (RANDERATH, 1962; MUES, 1988; FICARRA et al., 1984).
- Para placas de celulosa, se han llevado a cabo desarrollos monodimensionales con AcOH al 20 % (MARKHAM, 1982), y desarrollos bidimensionales con la fase superior de la mezcla nBuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:5)

(BAW), para la primera dirección, y ACOH al 30 %, para la segunda (ADZET *et al.*, 1988; MUES, 1988; MARKHAM, 1982).

3) Reveladores. Se han empleado los siguientes reactivos:

- Reactivo A de Neu: Se utilizaron soluciones metanólicas del éster  $\beta$ -aminoetílico del ácido difenilbórico de 98 % de pureza (NEU, 1957). Se ha descrito la utilización de soluciones del reactivo en MeOH, desde 0,3 % (MUES, 1988) y 0,5 % (WOLLENWEBER, 1982) hasta 1% (MARKHAM, 1982; SCHMID, 1978; SACHSE, 1988). Se probó el rango completo, observándose que el 0,6 % era una concentración suficiente para detectar los patrones. Una vez pulverizada con el reactivo, la placa se observa bajo luz UV de 254 nm. Se ha comprobado que aumenta la intensidad de los colores de las manchas tras una segunda pulverización con una solución al 2 % de PEG (polietilenglicol) 4000 en MeOH (MARTINEZ, 1980). También se han obtenido buenos resultados con soluciones de PEG 1000 en el mismo disolvente y a la misma concentración.

- Vapores de  $\text{NH}_3$ . Se pulveriza la mancha o la placa con amoníaco (MARTINEZ, 1980; SACHSE, 1988; VAN GENDEREN *et al.*, 1983; WEISSENBOCK *et al.*, 1987). Se han expuesto las placas a los vapores procedentes de una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 25 %. Como el efecto del  $\text{NH}_3$  desaparece rápidamente, se ha llevado a cabo la exposición introduciendo un recipiente lleno de reactivo en la cámara de UV.

- Reactivo de Benedict (REZNIK y EGGER, 1961). Este reactivo está compuesto por dos disoluciones: la solución I (17,3 g de citrato sódico y 11,7 g de carbonato sódico, disueltos en 10 ml de agua destilada) y la solución II (1,73 g de sulfato de cobre, en 10 ml

de agua destilada). El reactivo completo está compuesto por 9 partes, en volumen, de la solución I y 1 parte de la solución II.

- Vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (GARCIA-VALLEJO, 1973). Se preparó una solución que contenía 1 % de vainillina en EtOH al 96 %, a la que se añade 2 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, inmediatamente antes de la pulverización. Después, las placas se calientan en una estufa a 120 °C, durante 5-10 min y se observan las manchas a la luz visible.

- Vainillina-HCl (MUELLER-HARVEY, 1987). Se trata de una solución, recientemente preparada, que contiene 10 g de vainillina en 100 ml de una disolución 12M de HCl (HCl al 37 %). Tras la pulverización, las placas se trataron como se ha indicado en el punto anterior.

- 2,6-dibromoquinona clorimina (GARCIA-VALLEJO, 1973). Se prepara una solución de 2,6-dibromoquinona clorimina al 0,5 % en EtOH del 96 %. Tras la pulverización con este reactivo, las placas se expusieron a vapores de amoníaco, y se observaron bajo luz UV.

- Acetato básico de plomo (GOMEZ-CORDOVES *et al.*, 1978). Las placas se pulverizan con una solución comercial al 25 %. Las manchas se hacen visibles bajo luz UV.

Los valores de R<sub>f</sub>, obtenidos para aglicones y glicosidos, respectivamente, en CCF monodimensional sobre placas de gel de sílice y celulosa, con los eluyentes arriba descritos, se muestran en las tabla V.1.

Tabla V.1: Valores de R <sub>f</sub> para flavonoides.			
Flavonoide	Gel de sílice		Celulosa
	S1	S2	S3
<b>AGLICONES</b>			
Flavanona	0,71	0,96	0,70
Pinocembrina	0,74	0,96	0,69
Naringenina	0,60	0,96	0,68
Sakuranetina	0,70	0,96	0,65
Isosakuranetina	0,73	0,96	0,65
Hesperetina	0,69	0,96	0,66
Eriodictyol	0,48	0,96	0,65
Flavona	0,86	0,96	0,66
Crisina	0,72	0,96	0,00
Apigenina	0,55	0,96	0,16
Luteolina	0,40	0,96	0,13
Kaempferol	0,55	0,96	0,10
Quercetina	0,35	0,96	0,08
Miricetina	0,17	0,96	0,04
Fisetina	0,31	0,96	0,13
Taxifolina	0,32	0,96	0,73
Catequina	0,05	0,96	0,73
Epicatequina	0,05	0,96	0,66
Pelargonidina	0,00	0,73	0,49
Cianidina	0,00	0,73	0,00
Delfinidina	0,00	0,60	0,27
<b>GLICOSIDOS</b>			
Naringina	0,00	0,43	0,93
Hesperidina	0,00	0,41	0,93
Vitexina	0,00	0,58	0,35
Luteolín-7-glucósido	0,00	0,63	0,20
Kaempferol-7-neohesperidósido	0,00	0,38	0,54
Isoquercitrina	0,00	0,80	0,56
Hiperósido	0,00	0,74	0,52
Quercitrina	0,00	0,69	0,69
Rutina	0,00	0,45	0,75
Kuromanina	0,00	0,58	0,59
Cianidín-3-galactósido	0,00	0,53	0,56
Cianidín-3-rutinósido	0,00	0,46	0,72
Cianina	0,00	0,24	0,76

S1 = CHCl<sub>3</sub>-MeOH (93:7); S2 = AcOEt-MEK-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O (50:30:10:10); S3 = AcOH 20%.

Asimismo, la figura V.1 es el resultado de la superposición de cromatogramas bidimensionales individuales de cada patrón, en placas de celulosa.

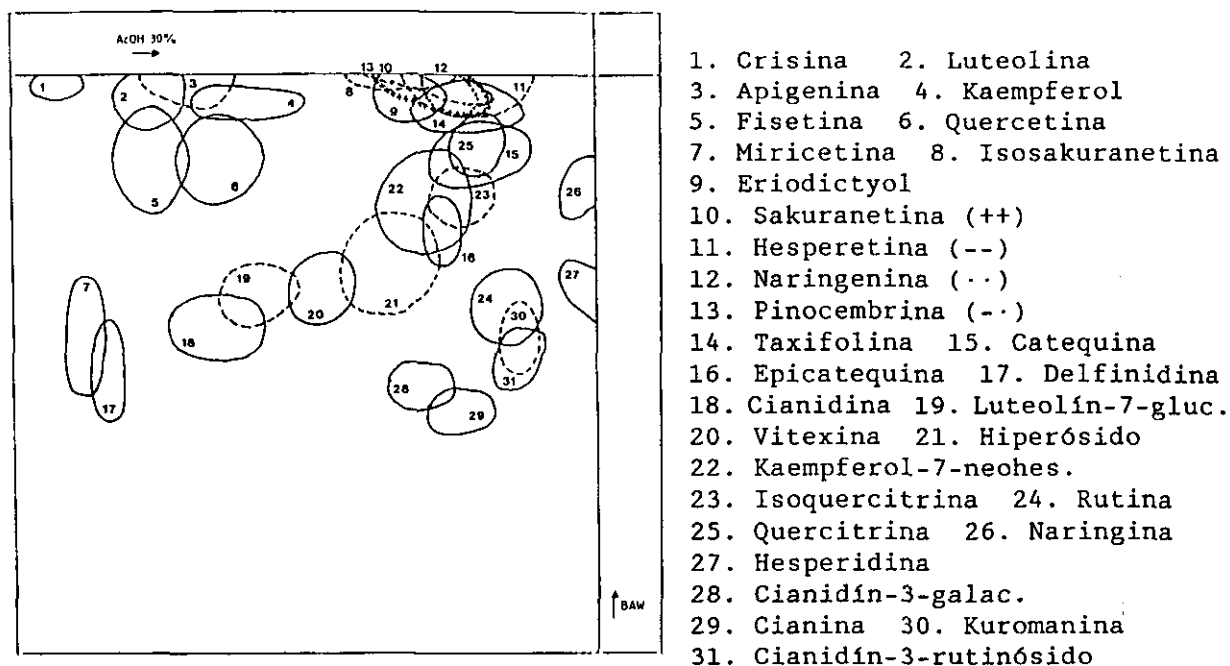


Figura V.1: Cromatoplaça bidimensional sobre celulosa, resultado de la superposición de cromatoplaças individuales de patrones.

Por último, la figura V.2 muestra la distribución de áreas de los diferentes grupos de flavonoides en un cromatograma bidimensional sobre celulosa.

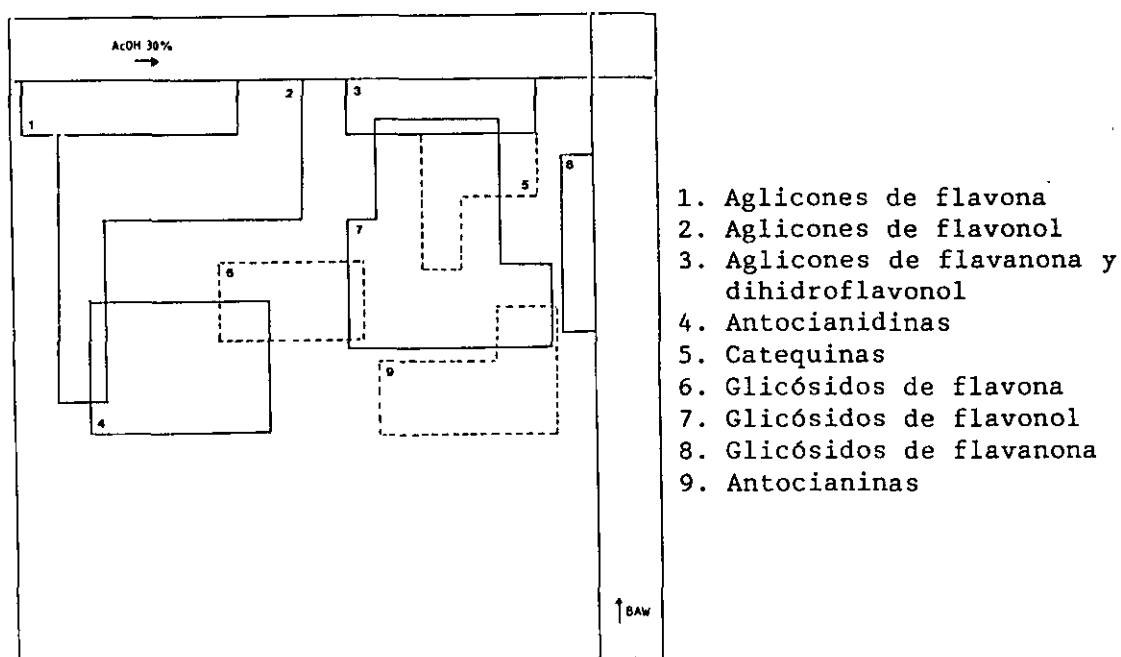


Figura V.2: Diagrama esquemático de las áreas de distribución de los diferentes grupos de flavonoides en una cromatoplaça bidimensional de celulosa.

A continuación, se exponen los resultados obtenidos con cada uno de los tipos de placas antes descritos.

## 1. Resultados en placas de gel de sílice

I) Con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (93:7), eluyente de baja polaridad, se cumplen las reglas de interacción entre los grupos activos de la sílice y los grupos polares de las moléculas: cuanto más polar es el compuesto, mayor es la retención. Por tanto:

a) Al aumentar el número de grupos hidroxilo (crisina / apigenina / luteolina; pinocembrina / naringenina / eriodictyol) disminuye el  $R_f$ , debido al incremento de la retención.

b) La metilación de grupos hidroxilo (naringenina / sakuranetina) disminuye la polaridad de la molécula, y aumenta el  $R_f$  como consecuencia de la reducción de la retención. La introducción de un grupo metoxilo implica un efecto similar a la pérdida de un hidroxilo en la misma posición; pero el  $R_f$  del compuesto metoxilado no es exactamente igual al del isómero no sustituido.

c) La eliminación de un grupo hidroxilo en  $C_3$  (transición flavonol-flavona) disminuye la polaridad. Esto es evidente para el caso de quercetina-luteolina (el  $R_f$  aumenta), pero no se cumple tan claramente para el caso de kaempferol-apigenina (con el mismo  $R_f$ ). Esto último puede ser debido a que el hidroxilo en  $C_3$  contribuye a la adsorción en menor medida que el resto de los hidroxilos, probablemente, debido a su interacción con el carbonilo en  $C_4$ .

d) El grupo hidroxilo en  $C_5$  presenta un comportamiento diferente a los de los hidroxilos que se encuentran en otras posiciones, como consecuencia del puente de hidrógeno, generado entre aquél y el carbonilo. Ello

provoca un descenso en la polaridad de la molécula, así como una disminución de su capacidad para ser adsorbida, lo que determina un incremento del  $R_f$  (quercetina / fisetina). La metilación del hidroxilo en  $C_5$  restaura dicha capacidad, y el  $R_f$  disminuye.

e) Las antocianidinas y todos los glicósidos presentan  $R_f=0$ , por su gran polaridad y baja solubilidad en este eluyente.

## II) Acetato de etilo-MEC-ácido fórmico-agua (50:30:10:10)

Dada la alta retención que presentaron antocianidinas y glicósidos en el eluyente anterior, se ensayó esta nueva mezcla de mayor polaridad, con la cual los aglicones (a excepción de las antocianidinas) emigran con el frente del eluyente. Del comportamiento de los patrones con este nuevo eluyente, se deduce que:

a) Las antocianidinas no siempre cumplen las reglas conocidas. La delfinidina (6 OH) muestra un  $R_f$  menor que la cianidina (5 OH), por su mayor polaridad. Sin embargo, cianidina y pelargonidina (4 OH) presentan valores de  $R_f$  semejantes.

b) Los diglicósidos resultan más fuertemente retenidos que los monoglicósidos, como se deduce de la comparación de los valores del  $R_f$  de la rutina con los de quercitrina, isoquercitrina e hiperósido; y los de la cianina y cianidín-3-rutinósido, con los correspondientes de kuromanina y cianidín-3-galactósido.

c) El azúcar unido al aglicón influye en la polaridad de la molécula y, por lo tanto, en su  $R_f$ . Así, los glucósidos tienen mayores  $R_f$  que los galactósidos; y estos, a su vez, que los ramnósidos (isoquercitrina / hiperósido / quercitrina).



## 2. Resultados en placas de celulosa

I) Desarrollos monodimensionales. No es posible obtener conclusiones acerca de la relación entre  $R_f$  y estructura, de manera análoga al caso de las placas de gel de sílice. El eluyente utilizado con la celulosa es más polar que el usado con la sílice. Sin embargo, se observa que:

a) Un aumento en el número de grupos hidroxilo incrementa la retención, igualmente que ocurría con la gel de sílice, excepto en el caso de las tres flavonas estudiadas.

b) La metilación de los grupos hidroxilo provoca un efecto opuesto sobre los valores de  $R_f$ , que en la gel de sílice, aunque la variación es más pequeña.

c) La presencia de un OH en  $C_5$  disminuye el  $R_f$  (fisetina / quercetina), al contrario de lo que ocurría en la gel de sílice.

d) La desaparición del doble enlace entre  $C_2$  y  $C_3$  disminuye la retención. Este efecto puede comprobarse comparando los valores de  $R_f$  de flavonas y flavanonas, como grupos completos, y de parejas de flavona y flavanona con el mismo patrón de hidroxilación (apigenina / naringenina; crisina / pinocembrina; luteolina / eriodictyol). También puede apreciarse al comparar los  $R_f$  de flavonoles y dihidroflavonoles (quercetina / taxifolina).

e) El efecto de la glicosilación es contrario al obtenido en la sílice. Hay un aumento del  $R_f$  al pasar del aglicón al monoglicósido; y de éste, al diglicósido.

II) Desarrollos bidimensionales. Se ha utilizado la fase superior de la mezcla de n-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:5), para la primera dimensión; y ácido acético al 30 %, para la segunda. Es importante notar que, dada la forma de preparación del primer eluyente, es difícil reproducir exactamente las condiciones entre ensayos, y, por ello, los valores del R<sub>f</sub>. Las manchas de los flavonoides, con estos eluyentes, aparecen en regiones de la placa bidimensional, similares a las predichas en la literatura para t-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (3:1:1) y AcOH al 15 % (MUES, 1988; MARKHAM, 1982). No obstante, en nuestro caso, se han obtenido mayores desplazamientos en la segunda dimensión.

La posición de las manchas en la placa bidimensional puede proporcionar información acerca de los grupos de flavonoides presentes en el extracto vegetal. El desarrollo bidimensional parece ser un buen método de separación para todos los grupos funcionales ensayados, a excepción de las flavanonas, que muestran valores de R<sub>f</sub> muy semejantes.

### 3. Resultados del revelado

I) Sobre placas de sílice. Las tabla V.2 muestra los colores obtenidos, para los diferentes flavonoides con los reveladores antes descritos. La observación bajo luz UV (254 nm) y los revelados con el Reactivo A de Neu, amoníaco y reactivo de Benedict no aportan suficiente información para la identificación de los diferentes flavonoides. No se obtienen cambios de color con el Reactivo A de Neu, ni con el amoníaco bajo luz UV; y el reactivo Benedict da lugar a colores amarillos inespecíficos.

Tabla V.2: Revelados de flavonoide en placas de gel de sílice con los reactivos de pulverización.

Flavonoide	UV <sub>254</sub>	R1	R2	R3	R4	R5
<b>AGLICONES</b>						
Flavanona	Mo	Mo	Mo	-	Ro	-
Pinocembrina	Am-Ma	Am	Am	-	Ro	Mo
Naringenina	Am-Ma	Am-Ma	Am-Ma	-	Ro	Az <sub>c</sub>
Sakuranetina	Am-Na	Am-Ma	Am-Ma	-	Ro	Az
Isosakuranetina	Am-Ma	Am-Ma	Am-Ma	Am	Ro	Mo
Hesperetina	Am-Ma	Am-Ma	Am-Ma	-	Rs	Az
Eriodictyol	Am-Ma	Am-Ma	Am-Ma	Am	Mo-Ma	Az-Gr
Flavona	Mo	Mo	Mo	-	-	-
Crisina	Mo-Ma	Am-Ma	Ma	Am	Am	Mo-Az
Apigenina	Am-Na	Am	Am	Am	Am	Az <sub>c</sub>
Luteolina	Rs-Na	Na-Ro	Rs-Na	Am	Am-Na	Az-Gr
Kaempferol	Rs-Na	Rs	Rs-Na	Am	Na	Az-Gr
Quercetina	Na	Na	Ma	Na	Am-Na	Az-Gr
Miricetina	Ma	Na	Ma	-	Na	Az-Gr
Fisetina	Am-Ma	Na	Am-Ma	Na	Am-Na	Az-Gr
Taxifolina	Ma	Rs	Ma	Am	Na	Az-Gr
Catequina	Ma	Am-Ma	Am-Ma	Am	Ro	Am-Ve
Epicatequina	Ma	Am-Ma	Am-Ma	Am	Ro	Am-Ve
Pelargonidina	Rs-Ma	Mo	Rs-Ma	Na	Ro	Rs-Am
Cianidina	Ro-Mo	Mo	Ro-Mo	Az	Ro	Rs
Delfinidina	Mo-Ma	Mo	Mo-Ma	-	Ro	Mo
<b>GLICOSIDOS</b>						
Naringina	Ma-Na	Rs	Az	-	Na	Az-Gr
Hesperidina	Ma	Am	Az	-	Na	-
Vitexina	Na-Ma	Am	-	-	Rs	Am
Luteolín-7-glucósido	Am-Ma	Ma	Am-Ma	Am	Rs	-
Kaempferol-7-neohesperi.	Ma	Ma	Ma-Mo	Am	Am	Am
Isoquercitrina	Na-Ma	Na-Ma	Ma-Mo	Am	Am-Na	Ve-Am
Hiperósido	Ma	Na-Ma	Ma-Mo	Am	Am-Na	Ve-Am
Quercitrina	Ma	Na	Ma	Am	Am-Na	Az-Gr
Rutina	Am-Ma	Am-Ma	Am-Ma	Am	Ma-Ve	Az-Gr
Kuromanina	Mo-Ma	Az	Ma-Mo	Az	Rs-Mo	Mo-Gr
Cianidín-3-galactósido	Mo-Ma	Az	Ma-Mo	Az	Rs-Mo	Mo-Gr
Cianidín-3-rutinósido	Mo-Ma	Az	Ma-Mo	Az	Rs-Mo	Mo-Gr
Cianina	Mo-Ma	Az	Ma-Mo	Az	Rs	Mo

R1 = Reactivo A de Neu + PEG; R2 = NH<sub>3</sub>; R3 = Reactivo de Benedict; R4 = Vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; R5 = 2,6-dibromoquinona clorimina.

Am = amarillo; Az = azul; Gr = gris; Ma = marrón; Mo = morado; Na = naranja; Ro = rojo; Rs = rosa; Ve = verde; <sub>c</sub> = claro; <sub>f</sub> = fluorescente.

Los reveladores que proporcionan identificaciones positivas son:

a) Reactivos de vainillina. La vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> da

buenos resultados que permiten el establecimiento de diferentes grupos:

- Flavonas: amarillo para aglicones; y rosa para glicósidos.
- Flavonoles: amarillo-naranja para ambos.
- Flavanonas: rojo para aglicones; y naranja para glicósidos.
- Dihidroflavonoles: naranja.
- Catequina, epicatequina y antocianidinas: rojo.
- Antocianidinas: rosa-morado.

El mismo rango de colores se ha obtenido con vainillina-HCl; pero son menos intensos, y no han sido incluidos, por ello, en las tablas correspondientes.

b) 2,6-dibromoquinona clorimina. Se trata de un reactivo específico para grupos fenólicos. Por tanto, los colores obtenidos dependen del número de grupos fenólicos libres; pero no, de funciones químicas características (flavona, flavonol, flavanona, etc). Por ejemplo, en los aglicones, el rango de colores varía desde azul-morado (2 OH), azul claro (3 OH), azul grisáceo (4 OH), hasta gris (5 OH). Flavona y flavanona no reaccionan. En el caso de las antocianidinas, las cuales presentan una intensa coloración previa al tratamiento, la reacción queda enmascarada. Para los glicósidos, el comportamiento ha sido diferente. El rango de colores se extiende desde amarillo hasta verde, sin ninguna relación aparente entre colores y estructuras. No se ha encontrado explicación a la falta de respuesta de la hesperidina y luteolín-7-glucósido.

II) Placas de celulosa. En este caso, se han estudiado tanto placas desarrolladas (ver tabla V.3), como no desarrolladas (ver tabla V.4), porque el AcOH, en contacto con la celulosa, produce una coloración morada en el adsorbente

cuando se observa bajo luz UV, que interfiere la apreciación de colores.

Tabla V.3: Resultado del revelado de flavonoides con diferentes reactivos, sobre placas de celulosa desarrolladas con AcOH al 20 %.

Flavonoide	UV <sub>254</sub>	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<b>AGLICONES</b>							
Flavanona	Mo	Mo	Na	-	-	-	-
Pinocembrina	Az	Am-Az	-	-	Ro	Az-Gr	Am-Az
Naringenina	Az	Az-Am	-	-	Ro	Az-Gr	Am-Az
Sakuranetina	Az	Am-Az	Az	-	Ro	Az-Gr	Am-Az
Isosakuranetina	Az	Am-Az	-	-	Ro	Az-Gr	Am-Az
Hesperetina	Az	Am	-	-	Ro	Az	Am
Eriodictyol	Az	Rs	-	-	Ro	Az-Gr	Am-Az
Flavona	Mo	Mo	-	-	-	-	Am-Az
Crisina	Ro	Na	Na-Rs	Am	Am	Ve	Ro
Apigenina	Am	Am	Am	Am	Am	Ve	Am
Luteolina	Am	Am <sub>f</sub>	Am	Am	Am	Am-Ve	Am-Na
Kaempferol	Am	Ve	Am	Am	Am	Am-Ve	Am
Quercetina	Am	Na	Am	Na	Am	Am-Ve	Na-Ma
Miricetina	Am	Na	Am	Ma	Am	Am-Ma	Na-Ma
Fisetina	Am <sub>f</sub>	Am	Am <sub>f</sub>	Na	Am	Am-Ve	Am
Taxifolina	Am-Na	Ma	Mo	-	Ro	Az <sub>f</sub>	-
Catequina	Mo-Ma	Ma	Az	-	Ro	Mo-Ro	-
Epicatequina	Mo-Ma	Ma	Az	-	Ro	Mo-Ro	-
Pelargonidina	Na-Ro	Na-Ro	Na	Az	Rs	Rs-Na	Am
Cianidina	Az-Ma	Az	Am	Am	Ma	Ma	-
Delfinidina	Mo	Az-Ma	Ve	Az	Rs	Az	Az-Ma
<b>GLICOSIDOS</b>							
Naringina	Ma	-	Az	-	-	Ve	Az
Hesperidina	Az	-	-	-	-	-	Az
Vitexina	Az	Am	Am	Am	Am	-	Am
Luteolín-7-glucós.	Na	Na	Am	Am	Am	Am	Am-Na
Kaempferol-7-neohe.	Am	Ve	Ve	Am	Am	Am-Ve	Am
Isoquercitrina	Am-Na	Am	Am-Na	Am	Am	Am-Ve	Am-Na
Hiperósido	Am	Am <sub>f</sub>	-	Am	Am	Am-Ve	Az-Ve
Quercitrina	Am-Na	Am	Am-Na	Am	Am	Am-Ve	Am-Na
Rutina	Am-Na	Am	Am-Na	Am	Am	Am-Ve	Am-Na
Kuromanina	Mo-Az	Az	Az	Az	Rs	Az	Az
Cianidín-3-galáct.	Mo-Az	Az	Az	Az	Rs	Az	Az
Cianidín-3-rutinós.	Mo-Az	Az	Az	Az	Rs	Az	Az
Cianina	Mo-Az	Az	Az	Az	Rs	Az	Az

R1 = Reactivo A de Neu + PEG; R2 = NH<sub>3</sub>; R3 = Reactivo de Benedict; R4 = Vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; R5 = 2,6-dibromoquinona clorimida; R6 = Acetato básico de plomo. Am = amarillo; Az = azul; Gr = gris; Ma = marrón; Mo = morado; Na = naranja; Ro = rojo; Rs = rosa; Ve = verde; c = claro; f = fluorescente.

Los resultados con los distintos reveladores son:

a) Observación directa a la luz UV. En placas desarrolladas, se obtuvo un amplio rango de colores: rojo-amarillo, para flavonas; amarillo-naranja, para flavonoles; azul, para flavanonas; amarillo-marrón, para dihidroflavonoles; morado-marrón, para catequinas y morado-azul-rosa, para antocianidinas y antocianinas. Sin embargo, en placas no desarrolladas, la mayoría de los flavonoides producen una coloración rosa-morada (excepto fisetina, que muestra un amarillo intenso).

b) Reactivo A de Neu + PEG. Se reprodujeron los colores en placas desarrolladas y no desarrolladas. Los colores, de acuerdo con los grupos químicos funcionales, son los siguientes: flavonas, amarillo-naranja; flavanonas, amarillo-azul; flavonoles, verde-amarillo-naranja; dihidroflavonoles y catequinas, marrón. Las antocianidinas muestran varios colores; y las antocianinas, derivadas de la cianidina, producen la misma coloración azul. La única diferencia detectada entre ambos tipos de placas, se localiza en las flavanonas, que no reaccionan en placas no desarrolladas, y en los glicósidos de quercetina, que producen coloración naranja, en placas no desarrolladas y amarilla, en las desarrolladas.

c) NH<sub>3</sub>. No se ha encontrado relación entre estructuras y colores, por lo que no es posible establecer una clasificación de los diferentes compuestos de acuerdo con los colores de sus manchas. Este resultado está en desacuerdo con los datos que aparecen en la bibliografía (MARTINEZ, 1980). Los flavonoles presentan el mismo color antes del revelado en placas desarrolladas y no desarrolladas. Los colores observados bajo luz UV, después de la exposición al NH<sub>3</sub>, cambian solamente en las placas no desarrolladas.

Esta variación es más evidente en el caso de los aglicones.

Tabla V.4: Resultado del revelado de flavonoides con distintos reactivos sobre placas de celulosa sin desarrollar.

Flavonoide	UV <sub>254</sub>	R1	R2	R3	R4	R5	R6
<b>AGLICONES</b>							
Flavanona	Mo	Mo	Mo	-	Ro	-	-
Pinocembrina	-	-	-	-	Rs	-	Am
Naringenina	Rs	Rs	Ro-Rs	Am	Ro-Rs	Az	Am
Sakuranetina	Rs	Rs	Az <sub>c</sub>	Am	Rs	-	Am
Isosakuranetina	Mo	Az	Mo-Az	Am	Rs	-	Am
Hesperetina	Rs	-	Rs	Am	Rs-Ro	-	Am
Eriodictyol	Rs	Rs	Rs	Na	Rs-Ro	Gr	Am
Flavona	Mo	Mo	Mo	-	-	-	Az
Crisina	Mo-Ma	Na-Ro	Mo	Am	Am	Az	-
Apigenina	Mo-Az	Am	Mo	Am	Am	Az	Am
Luteolina	Mo	Am	Na	Am	Am	Am-Ve	Am-Na
Kaempferol	Mo-Rs	Ve <sub>f</sub>	Am	Am-Na	Am-Na	Am-Ve	Am-Na
Quercetina	Na	Na <sub>f</sub>	Am	Na	Am-Na	Am-Ve	Na
Miricetina	-	Na	Am	Ma	Am-Na	Am-Na	-
Fisetina	Am <sub>f</sub>	Am <sub>f</sub>	Am <sub>f</sub>	Na	Am	Am-Ve	Na
Taxifolina	Rs-Mo	Na-Ro	Rs-Ro	Am	Rs	Rs	-
Catequina	Rs-Mo	Mo-Rs	Rs-Ro	Rs	Ro	Ro-Gr	-
Epicatequina	Rs-Mo	Mo-Rs	Mo	Rs	Ro-Na	Ro-Gr	-
Pelargonidina	Mo-Ro	Ro-Rs	Rs	Az	Rs-Re	Ro-Rs	-
Cianidina	-	Gr-Mo	Mo-Na	Az	Re	Rs	-
Delfinidina	-	Az	-	Az	Re-Ma	Mo-Az	Az
<b>GLICOSIDOS</b>							
Naringina	-	Am	Az	Na	Ro	Gr-Mo	Am
Hesperidina	-	-	Az	-	Rs	Gr	Am
Vitexina	Mo	Am	Ro	Am	Am-Gr	Rs	Am
Luteolín-7-glucós.	Mo	AmNa <sub>f</sub>	Am	Na	Am	-	Am
Kaempferol-7-neoh.	Na	Ve	Am	Na-Am	Am-Na	Am	Am
Isoquercitrina	Ro-Mo	Na <sub>f</sub>	Na-Ro	Am	Am	Am	Na
Hiperósido	Mo	Na <sub>f</sub>	Na	Am	Am	Am	Na
Quercitrina	Ro-Rs	Na <sub>f</sub>	Na-Ro	Na-Am	Am-Na	Ve	Na
Rutina	Ro-Rs	Na <sub>f</sub>	Na	Na-Am	Am-Na	Ve	Na
Kuromanina	Mo	Az	Mo	Az	Rs-Ro	Mo	Az
Cianidín-3-galáct.	Mo	Az	Mo	Az	Rs-Ro	Mo	Az
Cianidín-3-rutinó.	Mo	Az	Mo	Az	Rs-Ro	Mo	Az
Cianina	Mo	Az	Mo	Az	Rs-Ro	Mo	Az

R1 = Reactivo A de Neu + PEG; R2 = NH<sub>3</sub>; R3 = Reactivo de Benedict; R4 = Vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; R5 = 2,6-dibromoquinona clorimida; R6 = Acetato básico de plomo. Am = amarillo; Az = azul; Gr = gris; Ma = marrón; Mo = morado; Na = naranja; Ro = rojo; Rs = rosa; Ve = verde; <sub>c</sub> = claro; <sub>f</sub> = fluorescente.

d) Reactivo de Benedict. Resulta poco eficaz, al igual que sucedía con las placas de gel de sílice. Algunos flavonoides no reaccionaron; y aquellos que sí lo hicieron, mostraron colores amarillos y naranjas inespecíficos, excepto las antocianidinas que produjeron coloración azul.

e) Vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las condiciones drásticas (ácido + calor) a que se someten las placas producen un oscurecimiento de las mismas, que dificulta la apreciación de colores. Con una observación cuidadosa, es posible distinguir: flavonas, amarillo; flavonoles, amarillo-naranja (amarillo en placas desarrolladas); flavanonas, dihidroflavonoles y catequinas, rojo. El uso de vainillina-HCl no resuelve el problema.

f) 2,6-dibromoquinona clorimina. En este caso, el color parece depender más de los grupos químicos funcionales, que del número de OH, como ocurría con este revelador en gel de sílice. Se observó que las flavonas y flavonoles tienen tendencia hacia colores del rango amarillo-verde; las flavanonas, azul-gris; y catequinas, antocianidinas y antocianinas, rosa-morado-azul.

Comparando los trabajos de la bibliografía, en los que se utiliza cromatografía en papel con reveladores de NH<sub>3</sub> y Reactivo A de Neu, con nuestros resultados con CCF en celulosa, se observa que el comportamiento de flavonas y flavonoles es el mismo en ambos casos (GRAYER, 1989); pero flavanonas reaccionan de manera distinta (MARKHAM, 1989).

En vista de los resultados obtenidos, consideramos que la cromatografía bidimensional en celulosa es el mejor método de separación para la mayor parte de los grupos de flavonoides y, por lo tanto, es la más adecuada para el análisis de extractos vegetales complejos.



## 4.2. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ACIDOS Y ALDEHIDOS FENOLICOS

Se intentó adaptar los métodos de CCF, establecidos para los flavonoides, al análisis de ácidos y aldehídos fenólicos. Para ensayar dichos métodos, se utilizó un número reducido de patrones, presentes generalmente en los extractos de madera, corteza y hojas del género *Eucalyptus*.

Se realizaron desarrollos bidimensionales sobre placas de celulosa, que se revelaron con Reactivo A de Neu.

Los resultados de este ensayo se resumen en la tabla V.5.

Tabla V.5: Resultados de CCF de ácidos y aldehídos fenólicos en las condiciones de análisis de flavonoides.				
Patrón	R <sub>f</sub> 1ª Dimen. nBuOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (4:1:5) fase sup.	R <sub>f</sub> 2ª Dimen. AcOH 30 %	UV <sub>254</sub>	R1 React.A + PEG
Ac. protocatéquico	0,91	0,80	Az	Az-Ve
Vainillina	0,96	0,88	Mo	Mo
Acido vainíllico	0,93	0,80	Mo	Mo
Aldehído siríngico	0,95	0,85	Mo	Mo
Acido siríngico	0,97	0,89	Mo	Mo
Acido gálico	0,77	0,77	Mo	Az
Acido elágico	0,30	0,18	Am	Az

Asimismo, se ensayó un método específico de separación de ácidos y aldehídos fenólicos, consistente en desarrollos bidimensionales sobre placas de celulosa con:

- Acido fórmico, al 2 %, para la primera dimensión;
- Isopropanol-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (8:1:1) para la segunda (GOMEZ-CORDOVES *et al.*, 1978).

El revelado se realizó con acetato básico de plomo al 25 % (Panreac).

Los resultados obtenidos de este modo se esquematizan en la

tabla V.6.

Tabla V.6: Resultados del método específico de CCF para ácidos y aldehídos fenólicos.				
Patrón	R <sub>f</sub> 1ª Dimen. HCO <sub>2</sub> H 2 %	R <sub>f</sub> 2ª Dimen. Isopropanol-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O (8:1:1)	UV <sub>254</sub>	R6 Acetato bás. Pb
Ac. protocatéquico	0,50	0,15	-	Ma
Vainillina	0,90	0,70	Mo	Am
Acido vainílico	0,66	0,20	Mo	Ma-Mo
Aldehído siríngico	0,83	0,64	Ma	Na
Acido siríngico	0,62	0,18	-	Ma-Mo
Acido gálico	0,45	0,10	Mo-Ma	Ma-Mo
Acido elágico	0,20	0,05	Am-Ma	Ma

Ninguno de los sistemas de elución utilizados proporciona una separación adecuada, si bien, el desarrollo bidimensional en BAW (fase superior) y AcOH al 30 %, parece diferenciar los ácidos y aldehídos, como grupo, de los flavonoides; mientras la combinación de HCO<sub>2</sub>H al 2 % e isopropanol-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (8:1:1) permite una separación más efectiva de los distintos ácidos y aldehídos.

#### 4.3. METODO DEFINITIVO

Puesto que, en nuestro caso particular, se disponen de técnicas analíticas más sensibles y precisas que la CCF para la identificación y valoración de los componentes polifenólicos, se ha asignado a ésta, la misión de aportar información básica para la diferenciación de los distintos grupos de compuestos fenólicos presentes en los extractos, y para la identificación de algunos de sus componentes. En este sentido, se ha considerado que, de los métodos ensayados, el más conveniente para el análisis, por CCF, de los extractos etéreos de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus*, es el llevado a cabo sobre placas de celulosa Sigmacell microcristalina, tipo 20 (Merck), de 20 µm de tamaño de partículas, preparadas según se ha descrito previamente. El desarrollo es bidimensional con la fase superior de nBuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:5), para la primera dimensión; y AcOH 30 %, para la segunda. El revelado se realiza con Reactivo A de Neu + PEG.

**VI. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA  
RESOLUCION**

## VI. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

### 1. INTRODUCCION

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es una técnica que se ha desarrollado espectacularmente en los últimos años, gracias a los avances realizados en la instrumentación, tanto en la calidad de las bombas, como en la variedad de la naturaleza y tamaño de partícula de los rellenos de las columnas, y en la mejora de sensibilidad de los detectores. Comúnmente, se la conoce como HPLC, siglas inglesas de "High Performance Liquid Chromatography".

En el interior de la columna cromatográfica, una fase móvil líquida circula en contacto con la fase estacionaria. El mecanismo de separación se basa en la diferente afinidad que los solutos presentan por las dos fases, entre las que se distribuyen. Aquéllos que sean más afines a la fase móvil, serán eluidos más rápidamente, y los más afines a la fase estacionaria quedarán más retenidos, y tardarán más en salir de la columna.

Al tiempo que tarda una sustancia en ser eluida de la columna, se le llama tiempo de retención ( $t_R$ ); depende fundamentalmente de:

- Tipo de columna: dimensiones, naturaleza del relleno, tamaño de partícula.
- Fase móvil: flujo y composición.
- Temperatura.

El propósito del método puede ser analítico o preparativo, lo que determinará el tamaño de la columna y el tipo de instrumentación. Para procesos analíticos, son necesarias columnas más pequeñas, mayor presión y velocidad de flujo relativamente baja. Para procesos preparativos, columnas mayores, menor presión y mayor caudal.

La elución puede llevarse a cabo en régimen isocrático (condiciones constantes de flujo y concentración en la fase móvil), o en gradiente, modificando la composición (si se trata de una mezcla de varias sustancias) y/o el flujo de dicha fase.

Las primeras fases estacionarias, utilizadas en CLAR, eran de carácter polar. Se trataba de rellenos de sílice que interaccionan con la muestra por atracción electrostática. Su actividad depende del número de grupos activos de la sílice, presentes en la superficie del relleno. Con estos rellenos se utilizaban fases móviles apolares.

Posteriormente, se introdujo un nuevo tipo de fases estacionarias que resultan de la modificación de las anteriores por bloqueo de los grupos activos de la sílice con organosilanos de cadena lineal de 8 o 18 átomos de carbono (octadecilsilano,  $C_{18}$  y octilsilano,  $C_8$ ) o fenilsilanos. Estos empaquetamientos originan el llamado sistema de fase inversa o reversa, en el cual la fase estacionaria es de carácter apolar, y la fase móvil, es polar. Este tipo de columnas son las apropiadas para el análisis de compuestos fenólicos.

Por último, se han desarrollado otros tipos de columnas cuyos mecanismos de separación son diferentes a los descritos hasta ahora, cuya utilidad, para los compuestos que se estudian en este trabajo, es baja:

- Columnas de exclusión: Proporcionan separación en función del tamaño molecular en los mecanismos llamados de permeación en gel o filtración en gel. Aunque se están aplicando para la separación de polifenoles poliméricos como ligninas o taninos, sólo hemos encontrado un ejemplo de utilización para el caso de isoflavonoides (HARBORNE, 1985).
- Columnas de intercambio iónico. Sólo se ha descrito una aplicación a la separación de flavonol-sulfatos (HARBORNE, 1985).

Los sistemas de detección son muy variados, pudiendo emplearse distintas técnicas: espectroscopía UV-VIS, medida de índice de refracción, conductimetría, fluorimetría, etc.

## 2. APLICACION AL ANALISIS DE COMPUESTOS FENOLICOS. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

### 2.1. COLUMNAS

En la elección de la columna, hay que tener en cuenta el grupo de compuestos que se pretende separar, de manera que la columna elegida tenga buenas características de selectividad y poder de retención.

En cuanto al tamaño de partículas, parece que el más frecuentemente utilizado es el de 10  $\mu\text{m}$ , aunque se está imponiendo últimamente la utilización de rellenos de 5  $\mu\text{m}$ . Es menor el número de autores que utilizan 3  $\mu\text{m}$  (OSSWALD, 1985).

Aunque algunos trabajos describen la utilización de columnas  $\text{C}_8$  (WEISENBOCK *et al.*, 1987; PARK *et al.*, 1983; SINGLETON y TROUSDALE, 1983; HARBORNE, 1985; HOSTETTMANN y MARSTON, 1986), lo más frecuente es el empleo de columnas  $\text{C}_{18}$  (DAIGLE y CONKERTON, 1988; PIETTA *et al.*, 1985; MUELLER-HARVEY *et al.*, 1987; MCMURROUGH, 1981; WULF y NAGEL, 1976; COURT, 1977; VANDE CASTEELE *et al.*, 1982; SCHRAM *et al.*, 1983; BLOUIN y ZARINS, 1988; BANWART *et al.*, 1985; HERNANDEZ y SANCHEZ, 1980; NAGEL, 1985; SENDRA *et al.*, 1988; HASLER *et al.*, 1990; FERNANDEZ DE SIMON *et al.*, 1990).

Aunque prevalece el empleo de columnas rígidas de acero, también se están introduciendo los sistemas de columnas de compresión radial (ASEN, 1984; JAWORSKI y LEE, 1987), que parecen más duraderas.

La variedad de longitudes de columna, descrita en la bibliografía, es grande: desde 7,5 cm (BLOUIN y ZARINS, 1988) hasta 30 cm (PIETTA *et al.*, 1983; DAIGLE y CONKERTON, 1982).

Se recomienda el empleo de precolumnas, para prolongar la vida de la columna analítica (JERUMANIS, 1985; SENDRA *et al.*, 1988; PIETTA *et al.*, 1983; MUELLER-HARVEY *et al.*, 1987). Sin embargo, algunos autores son más partidarios de purificar el extracto vegetal, mediante técnicas de extracción en fase sólida, antes de su inyección en CLAR (SEO y MORR, 1984; GONZALEZ y PEREZ-ILZARBE, 1990), con lo cual se eliminaría el riesgo de contaminación de la columna, y sería menos necesaria la utilización de precolumnas.

## 2.2. ELUYENTES

Los eluyentes más habituales, utilizados en la separación de este tipo de compuestos son:

- Metanol-agua (DAIGLE y CONKERTON, 1982, 1988; PATRON *et al.*, 1985; SCHRAM *et al.*, 1983; MUELLER-HARVEY, 1987; ADZET *et al.*, 1988; BLOUIN y ZARINS, 1988; DONDI *et al.*, 1989; VANDE CASTEELE *et al.*, 1982; MARKHAM *et al.*, 1990).
- Acetonitrilo-agua, recomendado en algunos casos por su menor viscosidad frente a las mezclas metanol-agua (NAGEL, 1985; FICARRA *et al.*, 1984; DAIGLE y CONKERTON, 1988; WEISSENBOCK *et al.*, 1987; PIETTA *et al.*, 1983; DONDI *et al.*, 1989; OSZMIANSKI *et al.*, 1988).

En ciertas ocasiones, estas mezclas van acompañadas de ácidos (fórmico, acético, fosfórico) que facilitan la separación, impiden la formación de picos con cola, y evitan la disociación protónica de los hidroxilos fenólicos. El margen de pH recomendado es de 2-7, para evitar la alteración de los grupos alifáticos de la fase estacionaria.

Otro modificador orgánico, utilizado con menos frecuencia, es el tetrahidrofurano (THF) (DONDI *et al.*, 1989; SENDRA *et al.*, 1988; SHIN *et al.*, 1982).

En cuanto al régimen de elución, lo más recomendable para la separación de mezclas de compuestos fenólicos que incluyen ácidos fenólicos y flavonoides, es el empleo de gradientes lineales o curvos, siendo amplísima la variedad encontrada en la bibliografía.

### 2.3. DETECCION

Aunque la disponibilidad y alta sensibilidad de detectores de ultravioleta-visible (UV-VIS) determina que sean los más frecuentemente elegidos por la mayor parte de los investigadores, existe algún estudio sobre el empleo de otros tipos de detectores. Cabe comentar la utilización de detectores de UV y fluorescencia en serie (FARMAKALIDIS y MURPHY, 1967), y amperométricos (KITADA *et al.*, 1985) para el análisis de isoflavonas.

Los detectores UV de longitud de onda variable permiten la selección de longitudes de onda específicas para la cuantificación de ácidos, aldehídos y alcoholes fenólicos y flavonoides (OSSWALD, 1985; KARPPA *et al.*, 1984; SEO y MORR, 1984; HICKS *et al.*, 1985) y el reconocimiento del tipo de flavonoides que va a ser analizado (ASSEN, 1982).

La relación de absorbancias, obtenidas mediante dos o más detectores de longitud de onda variable, instalados en serie, aporta mayor información para la identificación de flavonoides y ácidos, aldehídos y alcoholes fenólicos (BANWART *et al.*, 1985; SACHSE, 1984). Tanto la técnica de barrido del espectro UV, a flujo parado (PARK *et al.*, 1983), como la de las relaciones de absorbancia a varias longitudes de onda, han sido usadas para identificar picos y valorar su pureza. No obstante, en este último caso, se recomienda utilizar relaciones de absorbancia entre varias longitudes de onda, en lugar de entre un sólo par (LAW y DAS, 1987).

Algunos autores están introduciendo la técnica innovadora de



los detectores espectrofotométricos de fotodiodos ("diode-array"), que permiten la obtención del espectro UV en cada punto del cromatograma. Los sistemas de CLAR, equipados con estos detectores, incluyen computadoras que facilitan el control del procedimiento cromatográfico, así como el almacenamiento de los espectros de la muestra y la posterior comparación de los mismos con los de sustancias patrón de referencia, archivados en librerías (ANDERSON, 1985; MAZZA, 1986; SCHAUFELBERGER y HOSTETTMANN, 1987; SIEWEK *et al.*, 1985). Otra innovación de estos sistemas de detección es la posibilidad de obtener mapas de contorno y perfiles tridimensionales de absorción UV, que favorecen el reconocimiento de componentes minoritarios, ocultos bajo grandes picos.

En algunos casos, la identificación de los componentes analizados se mejora por métodos de caracterización química. En lugar de recoger fracciones del eluido y hacerlas reaccionar con agentes de desplazamiento y obtener su espectro modificado en un espectrofotómetro UV, HOSTETTMANN *et al.* (1984) utilizan un sistema de formación de derivados post-columna, en el cual el agente de desplazamiento se introduce en el eluido de la columna, reacciona con los compuestos, ya separados, y los cambios espectrales producidos en ellos, son puestos de manifiesto por el propio detector del cromatógrafo, de forma continua.

LUNTE (1987) combina el empleo de detectores de fotodiodos con detectores amperométricos de doble electrodo.

#### **2.4. RELACION ENTRE ESTRUCTURA QUIMICA Y TIEMPO DE RETENCION**

Para estudiar la secuencia de elución, en CLAR en fase inversa, la más empleada, hay que tener en cuenta que los compuestos son adsorbidos inicialmente, por la fase estacionaria por interacción hidrofóbica, y, después, son eluidos por la fase móvil polar, debido al establecimiento de puentes de hidrógeno entre el compuesto y la fase móvil. Por ello, deben considerarse tanto las capacidades dadora y aceptora de protones del

compuesto, para la formación de puentes de hidrógeno, como su contribución a la interacción hidrofóbica. Podemos establecer, por ello, que, para los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, el orden de elución dependerá de:

I. Tamaño de la cadena lateral, para un único sustituyente del anillo benzoico: se eluyen en el orden  $C_6$ ,  $C_6-C_1$ ,  $C_6-C_2$ ,  $C_6-C_3$  (WULF y NAGEL, 1976).

II. Grupo funcional del sustituyente, suponiendo el mismo tamaño de la cadena, el orden de elución es: alcohol, ácido, aldehído y lactona (HERNANDEZ y SANCHEZ, 1980).

III. Número y tipo de sustituyentes del anillo benzoico: el orden de elución sería trihidroxi, dihidroxi, hidroxí, hidroximetoxi, hidroxidimetoxi, etc. Así, para ácidos fenólicos, el orden sería: gálico, protocatéquico, *p*-hidroxibenzoico, vainíllico y siríngico (WULF y NAGEL, 1976).

Para flavonoides, los factores que influyen en el tiempo de retención son:

I. Los hidroxilos contribuyen a la formación de puentes de hidrógeno con el eluyente y, por ello, un aumento del número de hidroxilos disminuye la retención: miricetina < quercetina (OSZMIANKI *et al.*, 1988) < kaempferol (LUNTE, 1987; MUELLER-HARVEY *et al.*, 1987).

II. En los grupos metoxilo, el oxígeno actúa como aceptor de protón en un puente de hidrógeno, y el metilo favorece las interacciones hidrofóbicas. Comparando series homólogas, vemos que la retención aumenta en el sentido de apigenina < genkwanina < 5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavona (ADZET *et al.*, 1988). Por otra parte, el balance de los dos efectos, generados por los grupos metoxilo, hace que el  $t_R$  de la tricetina-pentametiléter y el de la flavona no sustituida

sean iguales (VANDE CASTEELE *et al.*, 1982); lo mismo ocurre con crisoeriol e hispidulina (ADZET *et al.*, 1988).

III. El aceptor de protones más activo, en flavonas o isoflavonas, es el carbonilo que, debido a la resonancia, presenta carga negativa parcial. Si hay un OH en C<sub>5</sub>, éste puede formar un puente de hidrógeno con el CO y, por ello, se reduce la capacidad del grupo carbonilo de interaccionar con el disolvente. Como consecuencia de ello, los t<sub>R</sub> de flavonas, isoflavonas y flavonoles con OH en C<sub>5</sub> son mayores que los de sus homólogos sin OH en C<sub>5</sub>; por ejemplo, la biochanina A queda más retenida que la formononetina (GARCIA DE MARINA *et al.*, 1985; PIETTA *et al.*, 1983).

IV. Los 5,6-dihidroxi flavonoides son eluidos antes que los isómeros 5,8-dihidroxi, debido al puente de H interno entre los OH en C<sub>6</sub> y C<sub>5</sub>, que reduce la interacción entre el OH en C<sub>5</sub> y el CO.

V. El puente de H interno entre el CO y el OH en C<sub>3</sub> es más débil. No obstante, la separación de kaempferol y luteolina se atribuye a la menor polaridad del OH en C<sub>3</sub>, que la del OH en C<sub>3'</sub>, por la formación de ese puente de H.

VI. Si está presente un OH en C<sub>5</sub>, la introducción de otro grupo en posición C<sub>3</sub> disminuye el t<sub>R</sub>. Esto hace que se eluya antes un flavonol que una flavona, si el patrón de sustitución restante es igual (PARK *et al.*, 1983).

VII. La presencia de OH en posiciones distintas de las C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> provoca una fuerte reducción del tiempo de retención. Así, se observa un gran descenso con la presencia de OH en C<sub>7</sub>. No obstante, si existe un OH en orto respecto de la posición considerada, la disminución de t<sub>R</sub> es mucho menor. Se ha llegado a establecer que tiene más importancia para la separación el puente de H entre los OH en C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>, que el que se forma entre el OH en C<sub>3</sub> y CO (DAIGLE y CONKERTON,

1982).

VIII. La introducción de metoxilos en el anillo B provoca un gran aumento en el tiempo de retención. Para compuestos isoméricos que tengan hidroxilos y metoxilos en C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>, el compuesto con 3'-hidroxi,4'-metoxi eluye después que el 3'-metoxi,4'-hidroxi (crisoeriol < diosmetina)(ADZET *et al.*, 1988; PARK *et al.*, 1983). Las flavonas con dos metoxilos en el anillo B interaccionan con menos fuerza con la fase estacionaria, que las flavonas con un solo metoxilo en dicho anillo.

IX. Para compuestos 3',4'-dimetoxi, el incremento del número de OCH<sub>3</sub> en el anillo A aumenta el tiempo de retención (PARK *et al.*, 1983).

X. Flavonas 5,6,7 trisustituidas tienen un tiempo de retención más corto que las flavonas 5,7,8 sustituidas, cuando el patrón de sustitución restante es el mismo (PARK *et al.*, 1983).

XI. La saturación del anillo C (transformación de flavona en flavanona o de flavonol en dihidroflavonol) produce un incremento de t<sub>R</sub>, siempre y cuando no haya OH presentes. Si existen OH, el t<sub>R</sub> se reduce. Este fenómeno es debido a que la interrupción de la conjugación afecta a la acidez y a las posibilidades de formación de puentes de H por parte de los OH. Este efecto es más pronunciado en el caso de los OH en C<sub>3</sub>, que son fenólicos si existe el doble enlace C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, y alcohólicos si hay saturación (VANDE CASTELEEE *et al.*, 1982). Un factor que influye en la mayor polaridad de las flavanonas respecto a las flavonas, es la mayor densidad de carga del átomo de oxígeno del grupo CO de las flavonas, como consecuencia de las estructuras resonantes en las que este grupo adquiere carga negativa. Esta facilita la formación del puente de H entre el grupo CO y el OH en C<sub>5</sub>, lo que disminuye la polaridad de la molécula. Por otra

parte, en las flavanonas, el grupo CO puede estar fuera del plano del anillo floroglucinólico, lo cual debilita el puente de H con el OH en C<sub>5</sub> y, por lo tanto, facilita la exposición de ambos grupos al disolvente. Por el contrario, la estructura plana de las flavonas, con un fuerte puente de hidrógeno entre el carbonilo y el OH en C<sub>5</sub>, dificulta la interacción con el disolvente (WULF y NAGEL, 1976).

XII. El paso de flavona a isoflavona produce un gran descenso en el tiempo de retención (BANKOVA *et al.*, 1982).

XIII. La introducción de los grupos C-metil en el anillo A (en posiciones 5, 6, 8) produce un aumento de t<sub>R</sub>, aproximadamente, igual para las tres posiciones (BANKOVA *et al.*, 1982).

XIV. La glicosilación de un grupo OH implica no sólo la introducción de un grupo hidrofílico, sino también una forma de apantallamiento, bien sea por efecto estérico o por formación de puentes de H con otros OH presentes. La glicosilación en C<sub>7</sub> o C<sub>4</sub>, en ausencia de un OH en orto, reduce el t<sub>R</sub>, mientras la presencia de OH en orto hace que la disminución sea menor. La contribución de los distintos grupos de monosacáridos a la interacción hidrofílica desciende de las hexosas a las pentosas y a las metilpentosas.

XIV. La (+)-catequina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavano con orientación *trans* de los protones en C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>) es menos retenida que la (-)-epicatequina (isómero *cis* de la catequina) (MCMURROUGH, 1981; NAGEL, 1985; OZMIANSKI, 1988)

## 2.5. ANALISIS CUANTITATIVO

La existencia de patrones comerciales y el uso de columnas semipreparativas para el aislamiento de polifenoles puros de extractos vegetales, ha facilitado la cuantificación de este tipo

de compuestos.

Aunque la altura y, más exactamente, el área de los picos dan información sobre el orden de magnitud de cada compuesto (NICHOLLS y BOHM, 1982; MCMURROUGH *et al.*, 1982), para la determinación de la concentración es necesario el empleo de patrones internos (MORIMOTO *et al.*, 1986; HOSTETTMANN *et al.*, 1984; PARK *et al.*, 1983) o externos (BAJ *et al.*, 1983; ANDERSEN, 1985; MARBORNE *et al.*, 1985). La precisión y exactitud de un resultado cuantitativo depende de dos factores: área del pico y "factor de respuesta" del detector. Una buena calibración requiere que el patrón sea semejante, químicamente, al compuesto a calibrar.

## 2.6. APLICACION AL ANALISIS DE COMPONENTES FENOLICOS DEL GENERO *EUCALYPTUS*

La mayoría de los estudios sobre los componentes polifenólicos del género *Eucalyptus* en sus diferentes órganos, han utilizado como técnicas analíticas las cromatografías en papel o en capa fina. De hecho, sólo hemos encontrado un trabajo que aplique la CLAR. CHARRIER *et al.* (1992) valoran los contenidos de los ácidos gálico y elágico en madera de *E. globulus*. Utilizan una columna Lichrospher PR18E, de 5 µm de tamaño de partícula y de 10 cm de longitud; la elución es isocrática, con una mezcla diferente de MeOH-H<sub>2</sub>O-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para la valoración de cada uno de los dos ácidos, a un flujo de 1 ml/min. La detección se llevó a cabo en UV, a 280 nm.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. ENSAYOS PRELIMINARES

En el inicio del trabajo experimental, se utilizó un cromatógrafo de líquidos Konik mod. KNK-500-A, equipado con un detector de longitud de onda variable Spectroflow 757 de la misma firma y un integrador Konik KNK-825-318.

Para la puesta a punto de métodos de elución, se empleó una columna Nucleosil 120-C<sub>18</sub> (250 mm x 4 mm), de 10 µm de tamaño de partícula.

Dada la imposibilidad de trabajar con gradientes, se ensayaron distintos eluyentes en condiciones isocráticas, para seleccionar aquél o aquéllos que presentasen una separación adecuada de los patrones de que disponíamos.

En una primera etapa, se pusieron a punto los métodos para la separación de patrones de flavonoides, considerando la posibilidad de ampliarlos, más adelante, a patrones de ácidos y aldehídos fenólicos (ver Apéndice I de nomenclatura I.U.P.A.C. y procedencia de patrones comerciales).

Dichos patrones se agruparon según aglicones y glicósidos de: flavonas; flavonoles; flavanonas, dihidroflavonoles y catequinas, y antocianidinas. La detección se realizó a las longitudes de onda de las bandas características de cada grupo: 265, 365, 280 y 535 nm, respectivamente.

Tanto las soluciones de patrones, como, más adelante, los extractos, se filtraron a través de filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.

El volumen de inyección fue de 50 µl, y la temperatura del horno se fijó en 45 °C.

Para la preparación de los eluyentes, se utilizaron disolventes orgánicos de Reactivos Scharlau (calidad CLAR), agua bidestilada, purificada mediante un sistema Milli Q de Millipore, y filtrada a través de filtros de 0,45 µm, y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> puro de Reactivos Scharlau.

Se ensayaron, en primer lugar, eluyentes compuestos por mezclas de MeOH-H<sub>2</sub>O (a pH = 2,7, con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), cuyas proporciones variaron desde la (29:71) hasta la (55:45). De todas ellas, la

que proporcionó una mejor resolución fue la correspondiente a la relación (35:65), a flujo 1 ml/min, para la cual obtuvimos los valores de  $t_R$  de los patrones estudiados que figuran en la tabla VI.1.

Tabla VI.1: $t_R$ de patrones de flavonoides	
Columna	Nucleosil 120 C <sub>18</sub> (250 x 4 mm) 10 $\mu$ m
Eluyente	MeOH-H <sub>2</sub> O (pH = 2,7 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) (35:65)
Patrón	$t_R$ (min)
AGLICONES DE FLAVONA	
Crisina	17,38
Luteolina	53,57
Apigenina	84,01
AGLICONES DE FLAVANONA	
Eriodictyol	22,12
Naringenina	38,34
Hesperetina	53,22
AGLICON DE DIHIDROFLAVONOL	
Taxifolina	7,73
AGLICONES DE FLAVONOL	
Miricetina	23,05
Fisetina	23,21
Quercetina	46,60
Kaempferol	74,40
ANTOCIANIDINAS	
Delfinidina	10,45
Pelargonidina	12,10
Cianidina	18,33
GLICOSIDOS DE FLAVONA	
Vitexina	8,17
Luteolín-7-glucósido	12,93
GLICOSIDOS DE FLAVANONA	
Naringina	12,10
Hesperidina	13,70
GLICOSIDOS DE FLAVONOL	
Hiperósido	14,05
Isoquercitrina	15,02
Rutina	15,40
Quercitrina	23,62
Kaempferol-7-neohesperidósido	18,63
ANTOCIANINAS	
Cianina	3,01
Cianidín-3-galactósido	4,78
Kuromanina	4,83
Cianidín-3-rutinósido	5,21



Con esta fase móvil (mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O 35:65), las tres flavanonas, pinocembrina, sakuranetina e isosakuranetina, son eluidas a tiempos superiores a 120 min. Lo mismo ocurre para los patrones de isoflavonas, tectocrisina y prunetina. Por ello, se ensayó un nuevo eluyente: MeOH-H<sub>2</sub>O (50:50), también a flujo 1 ml/min, para flavanonas e isoflavonas, obteniéndose los valores de  $t_R$  que se muestran en la tabla VI.2.

Tabla VI.2: $t_R$ de patrones de flavanonas e isoflavonas	
Columna	Nucleosil 120 C <sub>18</sub> (250 x 4 mm) 10 $\mu$ m
Eluyente	MeOH-H <sub>2</sub> O (pH = 2,7 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) (50:50)
Patrón	$t_R$ (min)
Eriodictyol	6,53
Naringenina	9,87
Hesperetina	11,62
Pinocembrina	24,69
Sakuranetina	25,01
Isosakuranetina	25,06
Prunetina	31,52
Tectocrisina	53,27

Estas nuevas condiciones de trabajo podrían ser utilizadas en la separación de los dos grupos de flavonoides citados; pero no son aplicables a otros grupos, debido al gran adelanto producido en sus  $t_R$ .

También se ensayaron mezclas de metanol y agua acidificada con ácido acético a distintas concentraciones. De ellas, se seleccionó la mezcla de H<sub>2</sub>O-AcOH (95:5) y MeOH en la proporción (50:50), a flujo 1 ml/min, para la separación de aglicones flavonoídicos, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla VI.3. Este eluyente resultó ineficaz para la separación de antocianidinas.

La eficacia de separación en estos eluyentes en régimen

isocrático, no satisfizo suficientemente nuestros requerimientos y, por ello, consideramos la necesidad de trabajar con gradientes.

Tabla VI.3: $t_R$ de patrones de aglicones de flavonoides	
Columna	Nucleosil 120 C <sub>18</sub> (250 x 4 mm) 10 $\mu$ m
Eluyente	MeOH-(H <sub>2</sub> O-AcOH, 91,5:8,5) (50:50)
Patrón	$t_R$ (min)
FLAVONA	
Luteolina	6,89
Apigenina	9,81
Crisina	21,53
FLAVANONA	
Eriodictyol	4,48
Naringenina	5,79
Hesperetina	6,52
Pinocembrina	13,13
Sakuranetina	13,74
Isosakuranetina	13,71
DIHIDROFLAVONOL	
Taxifolina	3,30
FLAVONOL	
Miricetina	4,20
Fisetina	4,76
Quercetina	6,19
Kaempferol	9,59
FLAVANO	
Catequina	2,42
Epicatequina	2,66
ISOFLAVONA	
Prunetina	18,22
Tectocrisina	24,39

### 3.2. ESTUDIO POR CLAR DE LA EFICACIA DE LOS METODOS DE EXTRACCION

Para completar la información, relacionada con la selección del método de extracción de polifenoles del material vegetal, objeto de este estudio, se analizaron, por CLAR, los extractos obtenidos en la aplicación de los distintos métodos, descritos en el apartado IV.

Para estos estudios, se utilizó un cromatógrafo Beckman System Gold, con sistema de bombeo mod. 126, inyector automático mod. 502, programado para inyectar 20  $\mu$ l, y detector de fotodiodos mod. 128.

La columna empleada fue del tipo Nucleosil 120 C<sub>18</sub> (250 mm x 4 mm d.i.) de 10  $\mu$ m de tamaño de partícula.

La detección se realizó a las siguientes longitudes de onda: 325, 280, 320, 310 nm, con anchos de banda de 75, 5, 40, 180 nm, respectivamente.

Los eluyentes utilizados fueron A: MeOH y B: H<sub>2</sub>O-AcOH (91,5:8,5), con el siguiente perfil de gradiente, basado, con ligeras modificaciones, en el utilizado por TOMAS-LORENTE (1991, comunicación personal) para el análisis de flavonoides:

t (min)	A : B
0	10 : 90
25	50 : 50
35	80 : 20
40	80 : 20
45	10 : 90
50	10 : 90

El flujo fue de 1 ml/min, y se trabajó a temperatura ambiente.

### 3.3. METODO DEFINITIVO

Finalmente, el cromatógrafo seleccionado para el análisis de las muestras, fue un Hewlett-Packard mod. 1050 M, con sistema de bombeo cuaternario, inyector automático, detector de fotodiodos mod. 1040 M y estación de tratamiento de datos.

El detector se programó estableciendo distintos canales de adquisición de información, a cada uno de los cuales se le asignó un rango de longitudes de onda. El de aplicación general (de

longitud de onda 325 nm, con un ancho de banda de 150 nm) permite el reconocimiento y obtención del espectro de todos aquellos compuestos que presenten absorción en el UV. Asimismo, se establecieron canales específicos de detección: a  $280 \pm 2$  nm, característico de catequinas, proantocianidinas, flavanonas y dihidroflavonoles;  $360 \pm 5$  nm, para flavonas y flavonoles; y  $535 \pm 10$  nm, para antocianidinas.

No fue posible establecer un canal diferenciador de ácidos y aldehídos fenólicos, por la diversidad de máximos de absorción que presentan sus espectros.

Aunque en un principio se trabajó con el mismo tipo de columna Nucleosil 120 C<sub>18</sub> (250 x 4 mm d. i., 10 µm de tamaño de partícula) y con el gradiente antes comentado, la complejidad de las muestras y la necesidad de mejorar la resolución de la separación de ácidos y aldehídos fenólicos, nos obligó a ensayar nuevos sistemas eluyentes y nuevas columnas con menor tamaño de partícula y, por lo tanto, mayor eficacia. Se obtuvieron buenos resultados con columnas del tipo Hypersil ODS (200 x 4 mm d. i.) de 5 µm de tamaño de partícula.

En cuanto a los sistemas eluyentes, se ensayaron distintas composiciones y gradientes. Se modificó el agente acidificante, probando, además del ácido acético, los ácidos fórmico y fosfórico. Se comprobó la necesidad de acidificar, por igual, los dos componentes de la mezcla eluyente, es decir, el MeOH y el H<sub>2</sub>O, ya que, al utilizar detectores de fotodiodos, si sólo se acidifica el H<sub>2</sub>O, se produce una variación en la concentración de ácido a lo largo del gradiente y, por tanto, de la absorción UV de la mezcla eluyente, que provoca un desajuste en el detector.

El eluyente con el que se obtuvieron mejores resultados, fue el formado por: A: MeOH-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (999:1) y B: H<sub>2</sub>O-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (999:1) con el gradiente:

t (min)	A : B
0	20 : 80
40	100 : 0
45	100 : 0
50	20 : 80
55	20 : 80

El flujo fue de 1 ml/min y la temperatura del horno cromatográfico se fijó en 30 °C.

El volumen de inyección programado fue de 20 µl.

En las tablas VI.4 y VI.5, se reúnen los  $t_R$ , en estas condiciones, de todos los patrones de ácidos y aldehídos fenólicos y de flavonoides seleccionados (ver Apéndice I de nomenclatura I.U.P.A.C. y procedencia de patrones comerciales).

Tabla VI.4: $t_R$ de patrones de ácidos y aldehídos fenólicos en las condiciones definitivas de CLAR	
Columna	Hypersil ODS (200 x 4 mm) 5 µm
Eluyente	A: MeOH-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (999:1) B: H <sub>2</sub> O-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (999:1) Grad: 0-100 % A en 40 min, 40-45 min 100 % A
Patrón	$t_R$ (min)
Acido 3,5-dihidroxibenzoico	2,36
Acido 2,4,6-trihidroxibenzoico	2,42
Acido gálico	3,43
Acido 2,5-dihidroxifenilacético	3,94
Acido 2,6-dihidroxibenzoico	4,74
Acido protocatéquico	5,29
Acido cafeico	8,13
Acido vainílico	8,61
Acido sirínico	8,65
Acido clorogénico	8,94
Acido ferúlico	12,65
Acido salicílico	13,38
Acido eudésmico	15,91
Acido elágico	16,23
Acido rosólico	33,31
Aldehído protocatéquico	6,37
Vainillina	10,25
Aldehído sirínico	10,60

Tabla VI.5: $t_R$ de flavonoides. Método definitivo de CLAR	
Columna	Hypersil ODS (200 x 4 mm) 5 $\mu$ m
Eluyente	A: MeOH-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (999:1) B: H <sub>2</sub> O-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (999:1). Grad: 0-100 % A en 40 min, 40-45 min 100 % A
Patrón	$t_R$ (min)
AGLICONES DE FLAVONA	
Luteolina	21,53
Apigenina	23,91
Crisina	28,44
Flavona	29,12
AGLICONES DE FLAVANONA	
Eriodictyol	17,64
Naringenina	20,49
Hesperetina	21,59
Sakuranetina	26,45
Pinocembrina	26,68
Isosakuranetina	26,73
Flavanona	29,22
AGLICONES DE FLAVANO	
Catequina	4,22
Epicatequina	7,55
AGLICONES DE DIHIDROFLAVONOL Y FLAVONOL	
Taxifolina	11,66
Miricetina	17,37
Fisetina	17,89
Quercetina	20,26
Kaempferol	23,33
AGLICONES DE ISOFLAVONA	
Prunetina	27,75
Tectocrisina	33,92
ANTOCIANIDINAS	
Delfinidina	27,48
Pelargonidina	22,24
Cianidina	33,21
GLICOSIDOS DE FLAVONA	
Vitexina	13,24
Luteolín-7-glucósido	14,20
GLICOSIDOS DE FLAVANONA	
Hesperidina	14,03
Naringina	15,03
GLICOSIDOS DE FLAVONOL	
Hiperósido	15,41
Rutina	15,70
Isoquercitrina	15,79
Kaempferol-7-neohesperidósido	16,34
Quercitrina	17,51
ANTOCIANINAS	
Cianina	13,18
Kuromanina	14,71
Cianidín-3-rutinósido	15,25
Cianidín-3-galactósido	22,24

## **VII. IDENTIFICACION DE COMPUESTOS FENOLICOS**

## VII. IDENTIFICACION DE COMPUESTOS FENOLICOS

### 1. IDENTIFICACIONES DIRECTAS POR CLAR

La posibilidad de trabajar con detectores de fotodiodos y las librerías de espectros UV de patrones, facilita notablemente la identificación de compuestos fenólicos mediante CLAR.

Para confirmar las identificaciones provisionales de los compuestos presentes en corteza, madera u hojas, obtenidas por comparación de sus espectros UV con los de las librerías de patrones, se ha procedido de la siguiente manera:

I. Se comprueba la semejanza de los  $t_R$  del patrón y del compuesto en cuestión en el gradiente habitual.

II. Se aplica el método de enriquecimiento del pico, añadiendo una pequeña cantidad del patrón al extracto, lo cual producirá un aumento de tamaño del pico del compuesto. Esta mezcla se analiza nuevamente por CLAR en la columna Hypersil ODS, con los eluyentes: A: MeOH-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (999:1) y B: H<sub>2</sub>O-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (999:1), y con los gradientes:

- Grad 1: 20 - 100 % A en 40 min; 100 % A en 40 - 45 min.
- Grad 2: 10 - 50 % A en 25 min; 50 - 100 % A en 25 - 50 min.

Se comprueba si el pico del patrón-compuesto problema se desdobra o permanece como un único pico en los dos gradientes.

Si, tras la aplicación del método de enriquecimiento de pico, se confirma la identidad, se compara, por último, su comportamiento con el del patrón en CCF, sobre celulosa en desarrollo bidimensional, con BAW para la primera dimensión; y con AcOH 30 % para la segunda.



## 2. IDENTIFICACIONES POR CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS

La técnica cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se ha utilizado principalmente para identificar aquellos compuestos, suficientemente volátiles, de los que no disponíamos de patrones, y para el análisis de los azúcares, obtenidos en la hidrólisis de los glicósidos.

Los compuestos no identificados, se aislaron por CLAR semipreparativa y, tras eliminar el disolvente, se redisolviéron en la mínima cantidad de MeOH posible, para inyectarlos en el cromatógrafo de gases.

El equipo de CG-EM utilizado está formado por un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 5890, Serie II, acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett-Packard 5971. Este detector incluye una fuente de ionización por impacto electrónico y un filtro de masas de cuadrupolo. La energía de ionización fue 70 eV.

Se empleó una columna capilar HP-1 de metilsilicona (12m de longitud, 0,2 mm de diámetro y 0,33  $\mu\text{m}$  de espesor de película de fase), y se trabajó con las siguientes condiciones cromatográficas:

1. Para los compuestos menos volátiles, se estableció una temperatura inicial de 150 °C, alcanzando la temperatura final de 240 °C, con un gradiente de 10 °C/min. El sistema se mantuvo a la temperatura final durante 15 min.
2. Para los compuestos más volátiles, se fijó la temperatura inicial de 70 °C (que se mantuvo 5 min) y la final a 240 °C, con un gradiente de 3 °C/min. Se mantuvo esta temperatura final durante 5 min.

Para ambos casos, se estableció la temperatura del detector

a 300 °C y la del inyector a 240 °C.

El volumen y la forma de inyección se establecieron de acuerdo con la concentración de cada componente.

Las identificaciones se realizaron por comparación del espectro de masas del compuesto problema con los de la librería de espectros y/o con los encontrados en la bibliografía.

### **3. RECONOCIMIENTO DE GLICOSIDOS FENOLICOS**

El método que se describe a continuación, ha sido aplicado a la identificación de los componentes, cuyos  $t_R$  y sus espectros UV, obtenidos por CLAR, nos indujeron a pensar que podía tratarse de glicósidos flavonoídicos. Se aplicaron las técnicas de hidrólisis, tanto:

- a pequeñas porciones de extractos globales que contienen dichos compuestos, como
- a los compuestos purificados, parcial o totalmente, mediante CLAR, en las condiciones cromatográficas habituales.

De este modo, se pretende, bien confirmar una estructura que se predecía por el  $t_R$  y el espectro UV o bien, identificar el aglicón y el azúcar, componentes del glicósido flavonoídico.

#### **3.1. TECNICAS DE HIDROLISIS**

##### **3.1.1. Antecedentes bibliográficos**

Los métodos de hidrólisis de glicósidos flavonoídicos, descritos en la bibliografía, se pueden clasificar en tres grupos: de hidrólisis ácida, de hidrólisis alcalina y de hidrólisis enzimática.

A. Hidrólisis ácida. Dentro de este tipo de hidrólisis, se

han citado varios métodos en los que se varían reactivos y condiciones de trabajo:

A.I. Método estándar. Se emplea HCl en distintas concentraciones, sólo o mezclado con MeOH:

- HCl 2N (KHETWAL *et al.*, 1987; EL-GAMMAL y MANSOUR, 1986; SHARMA y CROWDEN, 1974; ALBORNOZ, 1980; SACHSE, 1988)
- HCl 12M (MUELLER-HARVEY *et al.*, 1987)
- HCl 5 % (WOO *et al.*, 1979)

Las condiciones de temperatura y tiempo de reacción son muy variadas; las más frecuentes son calefacción a reflujo a 100 °C, desde 30 min a 2 h.

Los tratamientos posteriores del hidrolizado son también diversos. En algunos casos, se recomienda la extracción, con AcOEt, del hidrolizado, para separar los aglicones (solubles en la fase de acetato de etilo) y los azúcares (que quedan disueltos en la fase acuosa) (MARKHAM, 1982; SACHSE, 1988; ALBORNOZ, 1980).

Otros autores aplican un proceso de purificación de aglicones mediante enfriamiento y cristalización (WOO *et al.*, 1979). En otros casos, se elimina el disolvente de la solución del hidrolizado en rotavapor, y el residuo seco se redissuelve en MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1), para su posterior análisis por CCF.

El tratamiento con HCl 2M, a 100 °C durante 2 h, produce la hidrólisis de los O-glucurónidos, pero no la de los C-glicósidos. No obstante, en estas condiciones, los 6- y 8- mono-C-glicósidos o los 6,8-C-diglicósidos, asimétricamente sustituidos, pueden experimentar una reorganización de Wesely-Moser, dando lugar a dos isómeros mayoritarios, fácilmente separables (MARKHAM, 1982).

El método estándar provoca la rotura de los grupos bisulfato, liberando  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La presencia de grupos sulfato en la fase acuosa, después de la extracción con  $\text{AcOEt}$ , se detecta mediante la adición de unas gotas de  $\text{BaCl}_2$  2M, con la aparición de un precipitado blanco de  $\text{BaSO}_4$  (MARKHAM, 1982).

A.II. Hidrólisis ácida suave. Se utilizan ácidos fuertes diluidos o ácidos débiles, solos o mezclados con  $\text{MeOH}$ . Se recomienda su aplicación en los siguientes casos:

a) En el estudio de poliglicósidos. MARKHAM (1982) establece el empleo de  $\text{HCl}$  0,2 M- $\text{MeOH}$  (1:1) a 100 °C, durante 10 min; o de ácido trifluoracético (TFA) 1M, a reflujo durante 30 min. La ventaja del TFA es su alta volatilidad, lo que minimiza el riesgo de hidrólisis posteriores, durante el proceso de eliminación de disolvente en rotavapor.

Con estos tratamientos, los 7-O-diglicósidos se convierten en 7-O-monoglicósidos, y los 3-O-diglicósidos se hidrolizan totalmente (MARKHAM, 1982).

b) Para el estudio de glicósidos, cuyos aglicones sean lábiles a ácidos (como sucede con algunos flavonoles). En estos casos, se ha descrito la utilización de TFA 2M- $\text{MeOH}$  (1:1), a reflujo durante 30 - 120 min (MARKHAM, 1982); o bien  $\text{HCl}$  0,1M, neutralizando con  $\text{NH}_4\text{OH}$ , antes de la concentración en rotavapor (EL-GAMMAL y MANSOUR, 1986).

B. Hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática es un método específico para determinar el tipo de enlace entre el

azúcar y el aglicón ( $\alpha$  o  $\beta$ ). Además, existen enzimas que catalizan la rotura específica de determinados enlaces aglicón-azúcar en O-glicósidos de flavonoides, facilitando su identificación (MARKHAM, 1982).

No obstante, sólo hay un número limitado de enzimas, disponibles comercialmente. Entre ellas, se pueden destacar:

- $\beta$ -Glucosidasa (emulsina). Hidroliza  $\beta$ -D-glicósidos y xilósidos, no procedentes de antocianidín-glicósidos (EL-GAMMAL y MANSOUR, 1986; MISHRA y MISRA, 1980).
- $\beta$ -Galactosidasa. Hidroliza  $\beta$ -D-galactósidos.
- $\beta$ -Glucuronidasa. Hidroliza  $\beta$ -D-glucurónidos.
- Pectinasa. Hidroliza  $\alpha$ -D-poligalacturónidos (y  $\alpha$ -D-ramnósidos).
- Antocianasa. Hidroliza la mayor parte de los glicósidos de antocianidinas.
- Ramnodiastasa. Hidroliza, sin alterar su estructura, oligosacáridos de los glicósidos.
- Naringinasa. Capaz de hidrolizar el naringenín-7-O-neohesperidósido a naringenina.
- Takadiastasa. Hidroliza  $\alpha$ -L-ramnósidos.

Los azúcares acilados y los C-glicósidos son resistentes a la hidrólisis enzimática.

C. Hidrólisis alcalina. Se utilizan soluciones con distintas concentraciones de NaOH o KOH, solos o con MeOH. Se pueden distinguir las siguientes variantes, dependiendo de los grupos de flavonoides a los que se apliquen:

C.I. Glicósidos. MARKHAM (1982) describe la utilización de KOH al 0,5 % en atmósfera de  $N_2$ , para evitar la oxidación de los aglicones liberados, con posterior neutralización con HCl 2M. Es un método de hidrólisis selectiva de azúcares en 7 ó (4'-), sin afectar a los que están unidos al 3-OH.

C.II. Acilos. Para esta aplicación, se recomienda la redisolución del glicósido acilado en  $H_2O$  o  $MeOH/H_2O$  y adición de  $NaOH$  2M (2 h y temperatura ambiente). Después, el hidrolizado se neutraliza con  $HCl$  2M, y se concentra a vacío. El ácido liberado se extrae con éter; en el residuo remanente, queda el glicósido desacilado.

Si el acilo está directamente unido al anillo flavonoídico, la hidrólisis produce un cambio en el espectro UV del flavonoide desacilado respecto al acilado.

### 3.1.2. Metodología

#### A) Ensayos preliminares

Dada la diversidad de métodos de hidrólisis encontrada en la bibliografía, decidimos ensayar los que consideramos más apropiados, y modificarlos para tratar de aumentar su capacidad de preservar los aglicones, liberados en la hidrólisis.

Para ello, se prepararon mezclas de volúmenes iguales de soluciones de 2 mg/ml de patrones:

- De aglicones, para determinar si las condiciones de hidrólisis afectan a la estructura de los aglicones liberados. Dicha mezcla está compuesta por: quercetina, hesperetina, luteolina, naringenina y kaempferol.
- De glicósidos, con distintos tipos de unión y en distintas posiciones de enlace:
  - Quercitrina, hiperósido, kaempferol-7-neohesperidósido, vitexina (C-glicósido) y hesperidina.
  - Luteolín-7-glucósido, rutina, isoquercitrina y naringina.

Se ensayaron los siguientes métodos de hidrólisis ácida:

- Estándar, con HCl 2N, a 100 °C durante 1 h, con y sin posterior neutralización con NH<sub>4</sub>OH al 25 %, en H<sub>2</sub>O (1:5).
- Suave, con ácido tricloroacético (TCA) 2N, a 100 °C, durante 30 min.
- Suave, con HCl 0,2N, a 100 °C durante 15 min, con y sin posterior neutralización.

El análisis cromatográfico de los hidrolizados permitió comprobar que estos métodos de hidrólisis ácida provocan la degradación de los aglicones de flavonol, y no afectan a los C-glicósidos.

Se ensayó también la hidrólisis alcalina, con KOH 0,5 %, a 100 °C durante 30 min. Se sustituyó la aplicación de la atmósfera de N<sub>2</sub> durante la hidrólisis, propuesta por la bibliografía, por el cierre a vacío de los viales de reacción.

Aunque este ensayo no fue satisfactorio, la diferencia de resultados obtenidos al hidrolizar con y sin vacío, nos indujeron a probar una hidrólisis ácida suave con vacío (TCA 2N, en vacío, 100 °C, 30 min). Este procedimiento preserva todos los aglicones flavonoídicos. Por tanto, es el método que proporciona mejores resultados.

#### B) Método definitivo

El método definitivo se basa en el de hidrólisis ácida suave en vacío, modificado por la sustitución de TCA por TFA. El TFA presenta la ventaja de su mayor volatilidad y de su más fácil eliminación, lo cual facilita el posterior análisis de azúcares. El esquema de este método es el que aparece en la figura VII.1.

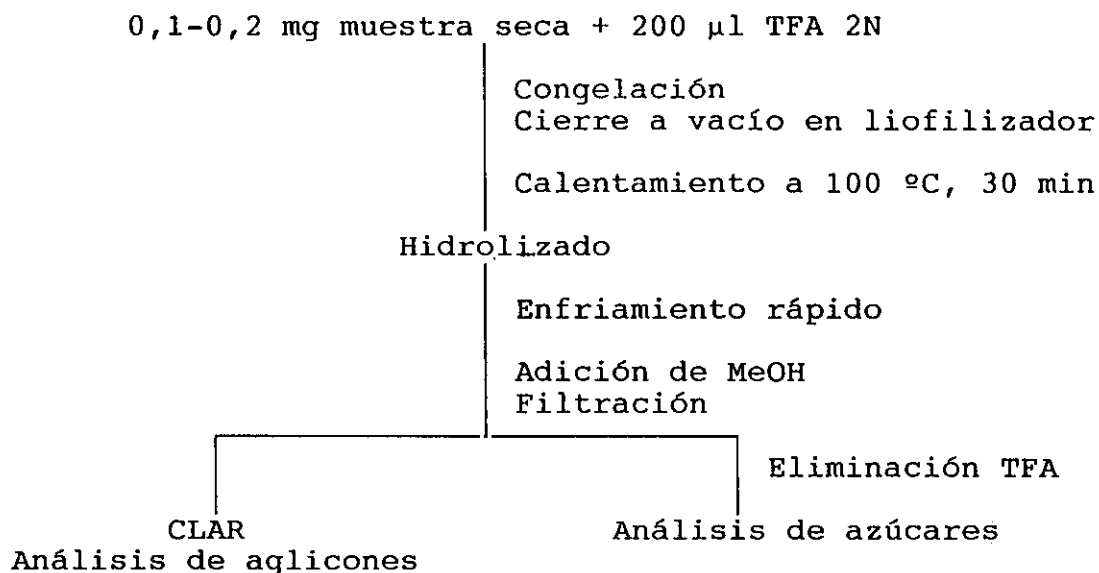


Figura VII.1: Esquema del método de hidrólisis de glicósidos flavonoídicos.

### 3.2. ANALISIS DE AGLICONES. DETERMINACION DE LA POSICION DE UNION DEL AZUCAR

Como ya se ha indicado en el esquema del método definitivo de hidrólisis, al hidrolizado se le añade MeOH para facilitar la redisolución de sustancias que quedan en suspensión.

Las muestras se filtran (a través de filtro de 0,45 mm), y se analizan por CLAR, en las condiciones descritas en el apartado VI.

Para la determinación de la posición de unión del azúcar, se comparan los espectros UV del aglicón y del glicósido. La glicosilación (especialmente en los hidroxilos en posiciones 3,5,7 y 4') provoca un desplazamiento de las bandas de absorción a longitudes de onda más cortas (MARKHAM, 1982). Se compara también el espectro del glicósido problema con bibliotecas de espectros de referencia. Puesto que la naturaleza del azúcar no afecta al espectro del glicósido, todos los glicósidos, formados por la unión de distintos azúcares a una misma posición de un aglicón, tendrán el mismo espectro.



### 3.3. ANALISIS DE AZUCARES

Al estudiar los métodos de análisis de azúcares, liberados en la hidrólisis de glicósidos fenólicos, se ensayó también el fraccionamiento del hidrolizado, mediante la extracción en fase sólida con cartuchos Sep-pak C<sub>18</sub>, para purificar los azúcares.

La purificación se llevó a cabo en los siguientes pasos:

1. Activación del cartucho mediante el lavado con volúmenes de 5-10 ml de MeOH y H<sub>2</sub>O, sucesivamente, secando el cartucho entre ambos lavados con uno y otro disolvente.
2. Introducción de la muestra disuelta en MeOH, secando a continuación el cartucho.
3. Elución de los azúcares con fracciones sucesivas de 1 ml de H<sub>2</sub>O, que se recogen independientemente.
4. Lavado con metanol, para eliminar los compuestos fenólicos retenidos.

El método de purificación se aplicó al hidrolizado, libre de TFA, redissuelto tanto en MeOH, como en agua. La solución acuosa, que, teóricamente, debería ser muy rica en azúcares, se purificó también por este método, para eliminar los compuestos fenólicos que pudiesen haber sido redissueltos en el agua.

El método de purificación no dio resultados satisfactorios. Por ello, se consideró conveniente avanzar en la búsqueda de técnicas de análisis de azúcares, sensibles y selectivas, que no precisasen del proceso previo de purificación. Se ensayaron las técnicas de CCF, CLAR, y cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).

### 3.3.1. Análisis de azúcares por CCF

#### 1) Antecedentes bibliográficos

Si bien se pueden emplear placas de sílice, de "Kieselgur", o de silicato de magnesio, el soporte más frecuentemente descrito en la bibliografía, para este tipo de análisis, es la celulosa (RANDERATH, 1965).

Sobre ella, se han utilizado diversos eluyentes:

- n-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:5) fase superior (BAW) (MARKHAM, 1982)
- n-BuOH-EtOH-H<sub>2</sub>O (4:1:2:2) (BEW) (MARKHAM, 1982)
- n-BuOH-benceno-piridina-agua (5:1:3:3) (BBPW) (MARKHAM, 1982)
- Isopropanol-piridina-ácido acético-agua (8:8:1:4) (SULSER, 1957).
- Acetato de etilo-piridina-H<sub>2</sub>O (2:1:2) (ISHERWOOD Y JERMYN, 1951).
- Acetato de etilo-piridina-AcOH-H<sub>2</sub>O (36:36:7:21) (MARKHAM, 1982)
- Acetato de etilo-piridina-AcOH-H<sub>2</sub>O (75:15:10:10) (DOUKENS-RENWART y ANGENOT, 1991)

Entre los reveladores, citados en la bibliografía, se pueden destacar:

- Ftalato ácido de anilina (PESCHKE, 1965; MARKHAM, 1982)
- Clorhidrato de *p*-anisidina (MARKHAM, 1982)
- Difenilamina/anilina/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (BAILEY y BOURNE, 1960; MARKHAM, 1982)
- Anilina/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (BRYSON y MITCHELL, 1951)
- Reactivo de Dedonder (nitrato de plata) (PETRONICI y SAFINA, 1953).
- Nitrato de plata/hidróxido sódico (Anónimo, Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel, 1958).

- Urea-HCl (DEDONDER, 1952).
- Antrona (JOHANSON, 1953).
- Naftoresorcina-ácido sulfúrico (PASTUSKA, 1961) o naftoresorcina-ácido fosfórico (GRUNDSCHÖBER y PREY, 1961).
- Anisaldehído-ácido sulfúrico (STAHL y KALTENBACH, 1961).

## 2) Metodología

Se han ensayado las siguientes soluciones acuosas de patrones: glucosa al 0,23 %, galactosa al 0,26 %, arabinosa al 0,28 %, lactosa al 0,23 % y sacarosa al 0,24 % (Merck) y ramnosa al 0,32 % (Biochemical Reagents), con las condiciones de CCF que se citan a continuación:

- Placas de celulosa: preparadas mezclando 15 g de polvo de celulosa "Sigmacell" microcristalina, tipo 20 (tamaño de partículas 20  $\mu$ m), con 60 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Una vez extendida la mezcla sobre las placas, éstas se secan en estufa a 100 °C durante 5-10 min.

- Eluyente: AcOEt-piridina-AcOH-H<sub>2</sub>O (75:15:10:10).

- Reveladores:

a) Reactivo de Dedonder. Se prepara mezclando 0,5 ml de una solución acuosa saturada de Ag(NO<sub>3</sub>) con 10 ml de acetona. A la mezcla, se le añade agua, gota a gota, hasta que el precipitado formado (blanco, algodonoso) se redisuelva.

Después de pulverizar la placa con la solución anterior, se expone a vapor de amoníaco, durante una hora. La placa se calienta, a continuación, en estufa a 80 °C. Las coloraciones se aprecian a la luz visible.

b) Nitrato de plata-hidróxido sódico. Consta de dos disoluciones:

- Solución I: el reactivo de Dedonder, descrito en el apartado anterior.
- Solución II: NaOH 0,5 N en MeOH acuoso.

Se pulveriza la placa, sucesivamente, con las soluciones I y II, y se calienta 1-2 min a 100 °C. La observación se realiza en luz visible.

c) Urea-HCl. Se disuelven 0,5 g de urea en 2 ml de HCl 2N, y se agregan 2 ml de EtOH. Después de pulverizar las placas con esta solución, se calientan a 100 °C hasta que se detecta la coloración de las manchas.

d) Antrona. Se siguió el método de preparación del revelador descrito por JOHANSON (1953), según el cual, se disuelven 0,15 g de antrona (Merck) en 5 ml de AcOH; se añaden 1 ml de H<sub>2</sub>O y 1 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 98 % y, después, 10 ml de EtOH absoluto. Sin embargo, la antrona resultó prácticamente insoluble en estas condiciones. Se filtró la suspensión de antrona, y con el filtrado se pulverizaron las placas, calentándolas, a continuación, durante 15 min a 100 °C y observándolas a la luz visible.

Los resultados de R<sub>f</sub> obtenidos se reúnen en la tabla VII.1.

Tabla VII.1: R <sub>f</sub> de patrones de azúcares	
Patrón	R <sub>f</sub>
Lactosa	0,03
Sacarosa	0,06
Galactosa	0,06
Glucosa	0,08
Arabinosa	0,14
Ramnosa	0,33

Sobre los reveladores, se puede concluir lo siguiente:

- De los reactivos de nitrato de plata utilizados, el que mejor resultado proporciona es el de Dedonder, con el cual todos los azúcares dan coloración marrón, siendo los más intensos los obtenidos con galactosa y arabinosa y los menos, los producidos por la ramnosa y la sacarosa.

- La urea-HCl reacciona muy débilmente, dando manchas azules, no específicas.

- El reactivo de antrona no proporciona buenos resultados. Sólo parecen reaccionar con él los disacáridos lactosa y sacarosa, dando coloración amarilla-naranja, difícilmente distinguible sobre el fondo oscurecido de la placa.

Puesto que se han utilizado concentraciones de azúcares bastante altas, los resultados hacen pensar que este método no es lo suficientemente sensible para permitir la identificación de los azúcares, procedentes de la hidrólisis de los glicósidos fenólicos, presentes en los extractos vegetales.

### 3.3.2. Análisis de azúcares por CLAR

#### 1) Antecedentes bibliográficos

Los mono y oligosacáridos pueden separarse por CLAR con diversos tipos de columnas. Las tres más frecuentemente utilizadas, son las de intercambio catiónico fuerte (con distintos tipos de resinas cambiadoras), las de intercambio catiónico débil (sílice con grupos amino ligados) y las de fase invertida (normalmente,  $C_{18}$ ).

Las columnas de intercambio catiónico fuerte permiten análisis rápidos y una completa elución de las muestras, si bien la resolución de oligómeros de alto peso molecular no es completa. La elución se desarrolla en orden decreciente de pesos moleculares (CHEETHAM *et al.*, 1981).

Las columnas de fase C<sub>18</sub> y las amino resuelven oligómeros de hasta 10 y 12 unidades, respectivamente. La elución es en orden creciente de pesos moleculares. Los oligómeros se eluyen como dobletes, ya que, al disolverse, forman anómeros. La reducción de los azúcares con borohidruro sódico evita la formación de anómeros (CHEETHAM *et al.*, 1981).

Las columnas C<sub>18</sub> proporcionan gran eficacia y eluciones más rápidas que las amino. Las columnas amino son, quizá, las menos afectadas por las interferencias de otros componentes de naturaleza no sacarídica. La separación de los monosacáridos se basa en la interacción de los grupos hidroxilo de los azúcares con la fase amino (BINDER, 1980). Arabinosa, xilosa y otras pentosas (con 4 grupos hidroxilo) se eluyen antes que las hexosas (con 5 grupos hidroxilo). La excepción es la ramnosa que, aún siendo hexosa, se eluye con las pentosas, por poseer sólo cuatro grupos hidroxilo.

Los detectores, más frecuentemente utilizados para el análisis de azúcares, son los de índice de refracción. Tienen la desventaja de su limitada sensibilidad, y las alteraciones que les producen los cambios de temperatura y las pulsaciones de presión de las bombas. Los detectores ultravioleta son más sensibles en longitudes de onda bajas, y se afectan menos por variaciones de temperatura y presión. La detección UV permite el empleo de gradientes de elución. No obstante, presenta la desventaja de estar sujeta a muchas interferencias, ya que la máxima sensibilidad de detección de azúcares se produce a longitudes de onda de 190 nm e inferiores. Esto obliga a que los eluyentes sean de alta pureza, puesto que las impurezas pueden producir ruido y limitar la sensibilidad a estas longitudes de onda.

Se están desarrollando métodos de derivación postcolumna, que aumentan considerablemente la sensibilidad y selectividad en el análisis de azúcares (VRANTY *et al.*, 1985; GANDELMAN y BIRKS, 1982; DEL NOZAL *et al.*, 1992).

En las columnas de resinas de intercambio iónico, se recomienda el empleo de agua como eluyente. En las amino y C<sub>18</sub>, se suelen emplear mezclas de acetonitrilo-agua, considerando que la retención de los azúcares disminuye al aumentar la proporción de agua.

## 2) Metodología

El análisis de azúcares, por CLAR, se llevó a cabo en un cromatógrafo Konik KNK-500, equipado con un detector de índice de refracción ERC-7520 (Erma Inc.) y un integrador Konik KNK-825-318.

La columna utilizada fue una CHO-682, especial para carbohidratos, (300 x 7,8 mm) empaquetada con una resina de intercambio catiónico con Pb<sup>2+</sup>.

Para la elución, se aplicaron las condiciones recomendadas por el fabricante de la columna. Estas son:

- Flujo: 0,4 ml/min
- Eluyente: H<sub>2</sub>O
- Tª horno: 90 °C

En estas condiciones, se inyectaron volúmenes de 50 ml de las soluciones de patrones de azúcares, preparadas para CCF, obteniéndose los t<sub>R</sub> recogidos en la tabla VII.2.

Las condiciones descritas permitieron una buena separación de los patrones, a excepción de ramnosa y galactosa que no se pudieron separar con esta columna. Ello supuso un gran inconveniente para la aplicación de la técnica a nuestro problema, dado que sospechamos la presencia de galactósidos y/o ramnósidos en los extractos de hojas de *Eucalyptus*.

Tabla VII.2: $t_R$ de patrones de azúcares	
Columna	-CHO-682 ( $Pb^{2+}$ )
Eluyente	H <sub>2</sub> O, 1 ml/min, 90 °C
Patrón	$t_R$ (min)
Sacarosa	15,40
Lactosa	17,05
Glucosa	18,08
Galactosa	22,05
Ramnosa	22,10
Arabinosa	23,18

Por otra parte, al aplicar la técnica a los hidrolizados, se aprecia que carece de la sensibilidad necesaria para detectar todos los azúcares liberados de los glicósidos fenólicos. Se decidió, entonces, ensayar la técnica de acoplamiento de cromatografía de gases-espectrometría de masas.

### 3.3.3. Análisis de azúcares por CG-EM

#### 1) Antecedentes bibliográficos

Los azúcares pueden ser analizados por cromatografía de gases con columnas capilares o empaquetadas; pero, para ello, deben ser transformados previamente, para convertirlos en sustancias suficientemente volátiles, bloqueando sus grupos hidroxilo e impidiendo la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares.

#### 1.A) Técnicas de derivación de azúcares.

Las técnicas de derivación, usadas en la cromatografía de gases, se engloban en tres bloques principales:

- Alquilación. Implica el reemplazamiento de un hidrógeno activo por un grupo alifático (METCALF y SCHMITZ, 1966) o aromático (KAWAHARA, 1968).



- Acilación. Es la conversión de compuestos que tienen hidrógenos activos, en ésteres, tioésteres y amidas, por la acción de un ácido carboxílico o de un derivado de un ácido carboxílico (DONIKE, 1978; SULLIVAN y SCHEWE, 1977; BENINGTON *et al.*, 1975).

- Sililación. Es la técnica de derivación más ampliamente utilizada para aplicaciones de cromatografía de gases. Los silil-derivados se obtienen por sustitución de hidrógenos activos de ácidos, alcoholes, tioles, aminas, cetonas enolizables y aldehídos por grupos trimetilsililo. El término sililación se usa como abreviatura de trimetilsililación, aunque también se utiliza para referirnos a la unión de grupos sililo, como dimetilsilil [ $-\text{SiH}(\text{CH}_3)_2$ ], *t*-butildimetilsilil [ $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ] y clorometildimetilsilil [ $-\text{Si}(\text{CH}_3)\text{Cl}(\text{CH}_3)_2$ ] (PIERCE, 1968; KNAPP, 1979).

A continuación, nos centramos en la técnica de la sililación y su aplicación al análisis de azúcares.

Los tiempos de reacción de sililación varían de unos compuestos a otros, en orden decreciente de facilidad de sililación, según: alcoholes (primario, secundario, terciario), fenoles, ácidos carboxílicos, aminas (primaria, secundaria) y amidas.

Los trimetilsilil derivados (TMS-derivados) presentan la ventaja de su alta estabilidad térmica. Sin embargo, el agua descompone tanto los reactivos como los TMS derivados. Su estabilidad hidrolítica es muy variable, influyendo en ella las características estructurales y estéricas de las moléculas.

Dado que los reactivos de sililación reaccionan con átomos de hidrógeno activos, deben evitarse todos los disolventes que los contengan, o que sean capaces de generarlos. Un exceso de reactivo puede utilizarse como disolvente, puesto que, además, el

producto sililado puede ser más soluble en el reactivo que el producto de partida. Se suelen usar, como disolventes, piridina, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y acetonitrilo (PIERCE, 1993). Entre los reactivos de sililación, se pueden destacar:

- Hexametildisilazano (HMDS). No es un buen donador de grupos trimetilsililo, pero presenta la ventaja de ser relativamente barato. No reacciona con grupos impedidos estéricamente, ni tampoco con átomos de hidrógeno, debilmente activos.
- N-dimetilsilildietilamina (TMSDEA). Más potente que el anterior, pero no es muy utilizado. Es particularmente útil para derivatizar ácidos de bajo peso molecular.
- N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA). Es un agente donador de grupos TMS, ampliamente usado, para la derivación de grupos alcoholes, aminas, amidas, ácidos carboxílicos, fenoles, esteroides y alcaloides. Los productos secundarios de la reacción son suficientemente volátiles, como para no interferir en la separación cromatográfica. Se pueden usar con trimetilclorosilano (TMCS) como catalizador, ya que, en su presencia, se aumenta tanto la velocidad de reacción como la capacidad del BSA para sililar grupos estéricamente impedidos. Aunque puede reaccionar en ausencia de disolvente, se suele usar con piridina o dimetilformamida (KLEBE et al., 1966).
- N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). Tiene un poder donador de TMS semejante al BSA, pero presenta la ventaja de que sus productos secundarios son más volátiles que los de éste y, por ello, interfieren menos (GEHKRE y LEIMER, 1971). Sus condiciones de utilización son semejantes a los del BSA.
- N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA). Tiene un poder donador semejante al del BSA y al BSTFA. Se ha

utilizado para preparar derivados volátiles, estables térmicamente, para cromatografía de gases-espectrometría de masas (HSU *et al.*, 1988). Tiene la ventaja de la gran volatilidad de la N-metiltrifluoracetamida, su subproducto. Se puede usar como los anteriores, disuelto en piridina y acompañado de TMCS, con lo que aumenta su capacidad sililante.

- N-metil-N-(*tert*-butildimetilsilil)-trifluoracetamida (MTBSTFA). Reacciona con grupos carboxilo, hidroxilo, tiol y aminas primarias y secundarias. Los TBDMS éteres son bastante más estables que los TMS éteres (BAZAN y KNAPP, 1982).

- N-trimetilsililimidazol (TMSI). Normalmente, reacciona sólo con grupos hidroxilo. Es útil para la sililación de hidroxilos impedidos estéricamente. Combinado con BSA, da una mezcla de gran capacidad de sililación.

En cuanto al análisis de azúcares, son varios los reactivos de obtención de los TMS-derivados descritos en la bibliografía. SWEELEY *et al.* (1963) desarrollaron un método que utiliza hexametildisilazano-trimetilclorosilano-piridina (2:1:10). Este método ha sido aplicado posteriormente por ARPINO *et al.*, (1977), por GARCIA-RASO *et al.* (1987, 1989) y MARTINEZ-CASTRO *et al.* (1989). KOUASSI *et al.* (1990) utilizan la misma mezcla de reactivos en la proporción (2:1:4); y MARKHAM (1982), en la proporción (2:1:2). Hay también referencias del empleo de trimetilsililimidazol (PIERCE, 1993; GOMEZ-CORDOVES, 1993, comunicación personal; GARCIA-RASO *et al.*, 1987, 1992).

En todos los casos, el problema que se plantea, en la obtención de los TMS-derivados de los azúcares, es que éstos, en disolución, se encuentran formando una mezcla, en equilibrio, de los anómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de los dos tipos de ciclos, de 5 eslabones (furanósido) y de 6 eslabones (piranósido). Por tanto, en teoría, cada azúcar podría formar 4 derivados diferentes. De hecho, al

analizar los TMS-derivados, es corriente encontrar más de un pico para un mismo azúcar. Se han propuesto varias soluciones a este problema; entre ellas, la reducción del grupo aldehído para formar el alditol (KLOK *et al.*, 1981; OSHIMA *et al.*, 1983).

#### 1.B) Análisis de los TMS-derivados por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

El principio de separación de la cromatografía de gases es el mismo que el de la cromatografía de líquidos. Sin embargo, en la cromatografía de gases (CG), la fase móvil es un gas y la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido.

La espectrometría de masas es una técnica de gran importancia en la identificación y elucidación estructural de compuestos orgánicos.

El fundamento de la espectrometría de masas es la generación, a partir de la molécula original, de partículas cargadas que se ordenan en función de su relación masa/carga.

El acoplamiento de un cromatógrafo de gases, con un espectrómetro de masas, conlleva un problema de compatibilidad, ya que la presión óptima de trabajo del espectrómetro de masas es de  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  torr, mientras que el cromatógrafo trabaja a presiones superiores a 760 torr. La interfase, entre ambos, debe atenuar la presión del gas portador sin provocar ensanchamientos de los picos.

Los sistemas ideados como interfases pueden ser:

- Divisores de flujo: que sólo permiten la entrada de una pequeña cantidad de gas en el espectrómetro.
- Separadores moleculares: aumentan la cantidad de muestra mediante una difusión del gas portador a través de membranas semipermeables.

Al analizar, por cromatografía de gases, los TMS-derivados de los azúcares, hay que tener en cuenta un conjunto de consideraciones. La afinidad que manifiestan los reactivos de sililación y los TMS-derivados por los átomos de hidrógeno activos, condicionan la elección de la columna. Hay que tener en cuenta que las fases estacionarias que contengan ese tipo de grupos, pueden verse dañadas irreversiblemente por estos productos. No se recomienda, por ejemplo, el empleo de polietilenglicoles, como el CARBOWAX.

Las siliconas son las fases estacionarias más utilizadas para el análisis de los TMS-derivados. La alta estabilidad térmica, tanto de estas fases estacionarias como de los reactivos y derivados, permiten trabajar en un amplio rango de temperaturas. Las fases más empleadas, en orden creciente de polaridad, son: metilsiliconas - SE-30 (GARCIA-RASO *et al.*, 1987, 1989), OV-1 (MARKHAM, 1982) y OV-101 (KOUASSI *et al.*, 1990; ARPINO *et al.*, 1977)-; las fenilmetilsiliconas - OV-17 y OV-25 (ARPINO *et al.*, 1977; GARCIA RASO *et al.*, 1987, 1989, 1992) -, y cianopropilmetilsiliconas y cianopropilfenilmetilsiliconas (GARCIA-RASO *et al.*, 1987, 1989).

También debe evitarse el empleo de inyectoros de acero inoxidable. Se recomienda el empleo de inyectoros de vidrio, o la inyección directa en columna (PIERCE, 1993).

La detección, por espectrometría de masas, presenta también ciertas ventajas cuando la separación cromatográfica es insuficiente, o existen dudas acerca de la identificación de los picos cromatográficos. Una detección selectiva de iones permite distinguir los picos procedentes de azúcares y los de compuestos fenólicos. También aporta información acerca del tamaño del anillo de ciclación de los azúcares (RADFORD y DE JONGH, 1972). Así, el espectro de masas de los TMS-piranósidos presenta un pico base de  $m/z$  204  $\{[(CH_3)_3Si-O-CH=CH-O-Si(CH_3)_3]^+\}$ , mientras que los TMS-furanósidos lo tienen a  $m/z$  217  $\{[(CH_3)_3Si-O=CH-CH=CH-O-Si(CH_3)_3]^+\}$ . Los espectros de masas de las formas  $\alpha$  y  $\beta$  no

difieren.

## 2) Metodología

El método elegido es el descrito por GIL-ALBERDI (1987), con ligeras modificaciones. Se seleccionó este método, en lugar de los más específicos de azúcares, con el fin de obtener no sólo los TMS derivados de los azúcares, sino también, los de los polifenoles que podrían estar presentes en la solución de hidrólisis. Se utilizan los siguientes reactivos:

- N,O-bis(trimetilsilil)-acetamida, BSA (Fluka)
- Trimetilclorosilano, TMCS (Fluka)
- Piridina anhidra, preparada mediante destilación sobre hidróxido sódico y dimetilsulfóxido.

Para la obtención de los TMS-derivados, pesamos, en un vial, 1 mg del azúcar a transformar en derivado y añadimos 0,2 ml de BSA, 0,1 ml de TMCS y 3 ó 4 gotas de piridina anhidra. El vial cerrado se mantuvo 2 h a 60 °C. Una vez frío, el producto de la reacción se inyecta directamente en el CG-EM.

Para los análisis de los azúcares, por CG-EM, se utilizaron el equipo y la columna descritos en el apartado VII.2. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura programada de 130-270 °C, con tiempo inicial de 1 min y un gradiente de 5 °C/min, manteniendo la temperatura final durante 15 min. La temperatura del detector se fijó en 300 °C y la del inyector en 270 °C.

Los patrones de azúcares se sometieron a las condiciones de hidrólisis y de derivación, descritas anteriormente, con el fin de determinar el efecto del doble tratamiento sobre las proporciones de las distintas formas de ciclación de los azúcares, que corresponden a picos diferentes en los cromatogramas de sus TMS-derivados.

En la tabla VII.3, se reúnen los resultados referentes a los  $t_R$  y las proporciones relativas de cada uno de los distintos picos, correspondientes de cada patrón.

Tabla VII.3: Comportamiento de los patrones de azúcares en CG-EM.			
Columna	HP-1 metilsilicona (12 m)		
Tª Programada	130-270 °C; 5 °C/min		
Patrón	$t_R$	Ciclación	Abundancia
Arabinosa	7,89	Furanosa	++++
	8,10	Piranosa	+
	8,36	Piranosa	++++
	8,94	Furanosa	+
Ramnosa	8,15	Piranosa	++++
	9,36	Piranosa	+++
	9,89	Furanosa	+
	10,31	Furanosa	+
Galactosa	12,15	Furanosa	+++
	12,94	Piranosa	++++
	13,89	Piranosa	++++
Glucosa	12,52	Furanosa	+
	13,42	Piranosa	++++
	15,31	Piranosa	++++
Fructosa	12,00	Furanosa	++++
	12,21	Piranosa	+
Manosa	11,14	Piranosa	++++
	11,74	Piranosa	+++
Xilosa	9,52	Piranosa	
Ac. galacturónico	13,36	Piranosa	+++
	15,21	Piranosa	++

La asignación estructural de las distintas formas de los azúcares, se ha realizado en base a las abundancias de los picos de  $m/z$  204 y 217 de sus espectros de masas.

Además de los monosacáridos que figuran en la tabla VII.3, se ensayaron dos disacáridos (sacarosa y lactosa), sometiéndoles a las condiciones de hidrólisis y posterior derivación. Este tratamiento produjo la hidrólisis del disacárido y la generación

de los monosacáridos integrantes que presentaron las mismas proporciones de las formas piranosa y furanosa, que los monosacáridos tratados individualmente.

La figura VII.1 contiene un cromatograma de CG-EM de la mezcla de patrones de azúcares, en el que se ha seleccionado el ión 204 para la representación.

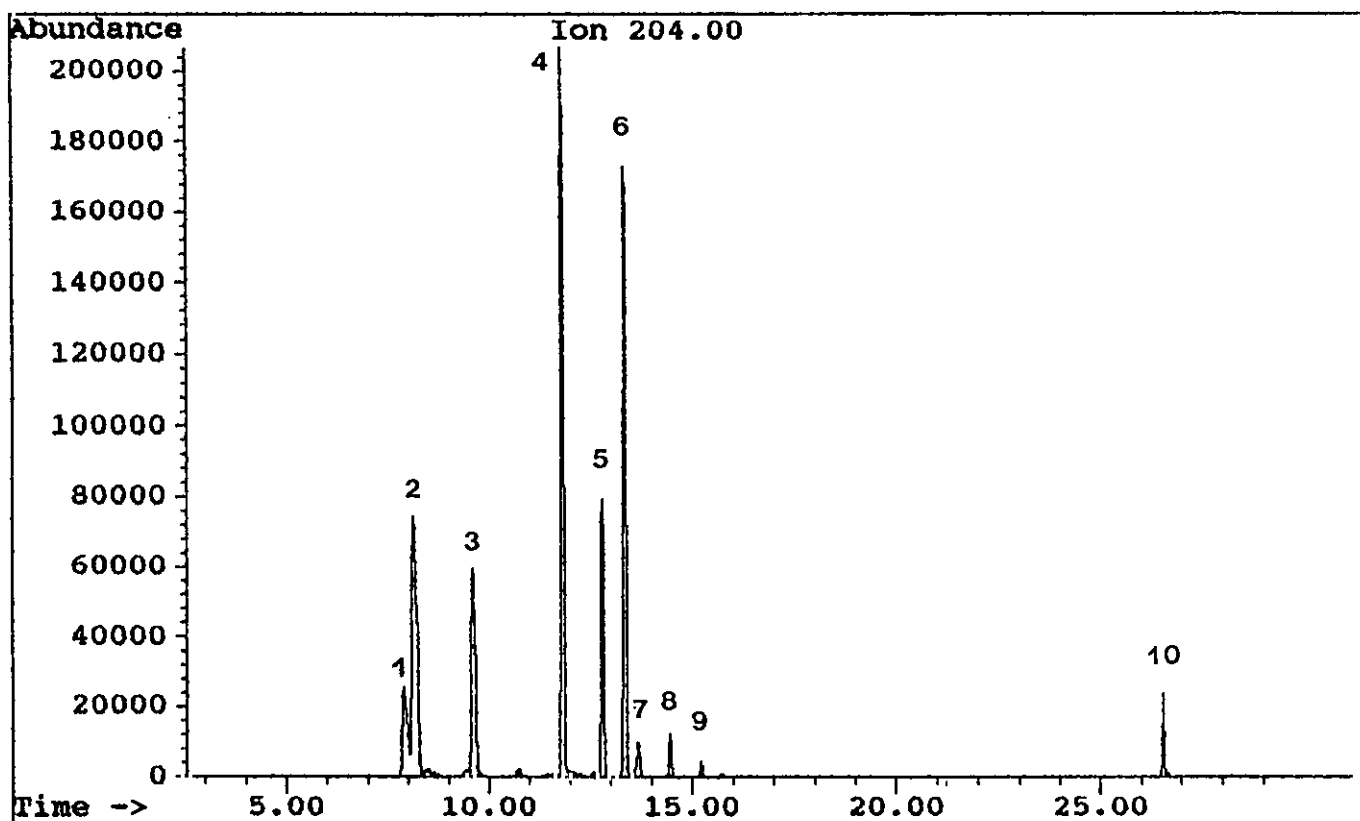


Figura VII.1: Cromatograma CG-EM de la mezcla de azúcares, mediante representación del ión 204. 1: arabinosa; 2: ramnosa; 3: xilosa ; 4: manosa; 5: galactosa; 6: glucosa; 7: galactosa; 8: ácido galacturónico; 9: glucosa; 10: sacarosa + lactosa.

Cuando el tratamiento de hidrólisis y derivación se aplicó a los extractos etéreos o a los glicósidos, aislados por cromatografía semipreparativa, las soluciones de hidrólisis se concentraron a sequedad (en estufa de vacío, a 45 °C), antes de la reacción de sililación.



**VIII. VALORACIONES CUANTITATIVAS Y  
SEMICUANTITATIVAS**

## VIII. VALORACIONES CUANTITATIVAS Y SEMICUANTITATIVAS

### 1. VALORACIONES CUANTITATIVAS

Se han realizado dos tipos de valoraciones cuantitativas de los compuestos polifenólicos, presentes en los extractos de madera, corteza y hojas: valoraciones globales del contenido de fenoles totales, mediante el método de Folin-Ciocalteu; y, valoraciones cuantitativas, por CLAR, de aquellos compuestos identificados de los que se disponía de patrones.

#### 1.1. METODO DE DETERMINACION DE FENOLES TOTALES DE FOLIN-CIOCALTEU

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una solución ácida de polímeros complejos de ácidos fosfomolibdicos y fosfowolfrámicos. Este reactivo, de color amarillo, oxida los fenolatos, reduciéndose los ácidos del reactivo, para dar lugar a un complejo azul de molibdeno-wolframio. En este proceso, se produce una reducción parcial del estado de valencia de Mo y W de +6 a +5. Una reducción completa, a la valencia más baja, destruye el color. No se conoce bien la naturaleza de estos complejos (SINGLETON y ROSSI, 1965).

Los fenoles sólo se oxidan rápidamente en un medio suficientemente alcalino. Pero, en estas condiciones, el reactivo oxidante y el pigmento azul son inestables. Por ello, el reactivo debe encontrarse en exceso, para que, aún a pH alcalino, se conserve inalterada al menos una fracción el tiempo necesario para reaccionar con todos los fenolatos.

El método utilizado está basado en el de SINGLETON y ROSSI (1965). Estos autores estudiaron las características diferenciadoras de los reactivos de Folin-Denis y Folin-Ciocalteu, y modificaron este último reactivo para incrementar su sensibilidad y selectividad frente a los fenoles. En este trabajo se selecciona la longitud de onda de 760 nm, como óptima, para la

lectura de absorción del complejo azul.

Estos autores recomiendan la utilización de una serie de compuestos como patrones, para la obtención de curvas de calibración. De ellos, hemos seleccionado la quercetina, por considerar el compuesto más característico, dentro de los distintos grupos estructurales identificados en las muestras estudiadas.

Se diluyeron las muestras para que los productos de reacción diesen unos valores de absorbancia inferiores o iguales a 0,5.

El método aplicado fue el siguiente: a 0,5 ml del extracto acuoso diluido (ver Figura IV.5 del esquema definitivo de extracción), se le añaden 2,5 ml de una solución acuosa, al 10% del reactivo Folin-Ciocalteu Merck y 2 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,35 N. La mezcla se mantiene durante 5 min, en baño maría a 50° C. Después se enfría y se centrifuga, si se observa aparición de precipitado. Se mide la absorbancia a 760 nm.

La curva de calibración se prepara con soluciones acuosas de 2,5-40  $\mu\text{g/ml}$  de quercetina, sometidos al mismo tratamiento que las muestras. La recta cumple la ecuación de Lambert-Beer, en la que la pendiente corresponde al coeficiente de extinción molar, y la ordenada en el origen es cero. Se ha elaborado con tres repeticiones para cada concentración, aplicando el método de mínimos cuadrados para el ajuste de los valores obtenidos. El coeficiente de extinción molar, para la quercetina, es  $45,4 \times 10^3$ .

## 1.2. VALORACION CUANTITATIVA POR CLAR

Para la valoración cuantitativa, por CLAR, de los compuestos identificados en las muestras, se prepararon las correspondientes rectas de calibración, utilizando patrones comerciales.

Las condiciones cromatográficas, para la elaboración de las

rectas, fueron las expuestas en el apartado VI.3.3. La detección se realizó a 325 nm, con un ancho de banda de 150 nm.

Para cada patrón, se seleccionó el rango de concentraciones apropiado al contenido de ese compuesto en las muestras.

Las ecuaciones de las rectas de calibración se calcularon por el método de mínimos cuadrados. En estas ecuaciones, los valores de  $y$  corresponden a las concentraciones de los patrones; y las de  $x$  a las áreas de los picos cromatográficos, expresadas en unidades de integrador. El umbral de integración se establece en 1 unidad.

En la tabla VIII.1, se reúnen los datos de los rangos de concentraciones y ecuaciones de las rectas de calibración para cada uno de los patrones.

Tabla VIII.1: Rectas de calibrado de patrones para valoraciones cuantitativas por CLAR.			
Patrón	Rango de concent. (mg/ml)	Ecuación de la recta de calibrado $y = ax + b$	Coefic. correl. ( $r^2$ )
Ac. protocatéquico	0,050 - 1,000	$y = 8,4 \cdot 10^{-5} x - 1,61 \cdot 10^{-2}$	0,996
Ald. protocatéquico	0,020 - 1,000	$y = 6,2 \cdot 10^{-5} x - 5,65 \cdot 10^{-3}$	0,996
Vainillina	0,010 - 0,600	$y = 5,0 \cdot 10^{-5} x - 9,54 \cdot 10^{-3}$	0,996
Acido gálico	0,020 - 0,600	$y = 9,6 \cdot 10^{-5} x - 2,85 \cdot 10^{-2}$	0,991
Acido elágico	0,002 - 0,040	$y = 3,3 \cdot 10^{-5} x + 8,10 \cdot 10^{-5}$	0,999
Quercetina	0,050 - 1,000	$y = 4,9 \cdot 10^{-5} x - 6,29 \cdot 10^{-2}$	0,998
Luteolina	0,020 - 1,200	$y = 6,3 \cdot 10^{-5} x - 3,29 \cdot 10^{-2}$	0,991
Naringenina	0,010 - 1,000	$y = 8,9 \cdot 10^{-5} x - 1,64 \cdot 10^{-2}$	0,996
Kaempferol	0,005 - 0,300	$y = 1,9 \cdot 10^{-5} x - 1,06 \cdot 10^{-2}$	0,996
Eriodictyol	0,050 - 1,000	$y = 1,26 \cdot 10^{-4} x - 4,90 \cdot 10^{-3}$	0,996
Taxifolina	0,010 - 1,000	$y = 1,06 \cdot 10^{-4} x - 1,95 \cdot 10^{-3}$	0,990
Apigenina	0,010 - 0,250	$y = 5,9 \cdot 10^{-5} x - 1,02 \cdot 10^{-2}$	0,998

Inicialmente, se asignó el calificativo de "trazas" a las concentraciones, correspondientes a picos cuyas áreas eran inferiores al valor de la abscisa en el origen, para cada una de las rectas. Para homogeneizar los resultados, se modificó este

concepto de "trazas", asignándolo a las concentraciones correspondientes a los valores de áreas por debajo del valor máximo de abscisa en el origen de todas las rectas de calibrado (290 unidades de integrador). Las excepciones fueron luteolina y kaempferol, para las cuales el término de "trazas" correspondió a áreas por debajo de 550 unidades de integrador, y quercetina, para áreas inferiores a 1280 unidades.

## 2. VALORACIONES SEMICUANTITATIVAS

Todos aquellos picos que no han podido ser identificados, o de los que sólo se conoce el grupo polifenólico a que pertenecen, no pudieron ser cuantificados por el método del patrón externo, descrito anteriormente.

En estos casos, se ha procedido a valorar semicuantitativamente los compuestos, mediante integración de sus picos cromatográficos, en las condiciones de análisis por CLAR, descritas previamente. De esta forma, teniendo en cuenta los diferentes factores de dilución de las muestras, es posible comparar las concentraciones de un mismo compuesto en distintas muestras. Sin embargo, puesto que cada compuesto tiene un coeficiente de extinción diferente, no se puede establecer una equivalencia entre las áreas de los distintos picos, de una misma muestra y las concentraciones de los componentes correspondientes.

## **IX. ANALISIS NUMERICO**

## IX. ANALISIS NUMERICO

Las variables que se han considerado, como objeto de análisis estadístico dentro de este estudio, son de dos tipos:

1. Variables continuas, entre las que se encuentran los rendimientos globales (extractos metanólicos) y rendimientos de las fracciones solubles en éter (extractos etéreos), los contenidos en fenoles totales y los resultados de los análisis de caracterización de maderas.

2. Variables discretas. Si bien hubiésemos preferido la utilización de variables continuas, nos hemos visto obligados a tratar, como discretas, una serie de variables, empleando un método semejante al utilizado por los ecólogos para el estudio de la presencia y abundancia de especies en los diversos nichos ecológicos.

En la realización del análisis numérico, encontramos problemas al tratar de comparar la abundancia relativa de los distintos componentes químicos de los extractos de madera, corteza y hojas (incluidos los de los aceites esenciales) de las tres especies del género *Eucalyptus*. En algunos casos, fue posible cuantificar, de forma precisa, la concentración de determinados compuestos, por disponer de patrones comerciales que permitían la elaboración de curvas de calibración; pero, en la mayoría de los casos, se realizó una valoración aproximada, basada en las áreas de los picos cromatográficos de cada componente.

Para establecer un criterio uniforme, se decidió valorar los componentes químicos como variables, representadas por las áreas de sus picos cromatográficos, independientemente de si se podía cuantificar su concentración de forma exacta o no.

La ausencia absoluta de algunos componentes, en algunas de las muestras, aumentó la necesidad de utilizar variables

discretas. Aquellos compuestos en los que todos los datos presentaban distribución continua y asimilable a la normal, pudieron ser tratados en forma de variable continua para su análisis independiente, pero transformadas en variables discretas cuando se analizaban conjuntamente con las demás. Dicha transformación se realizó, de forma independiente, para cada variable, según su rango de variación.

Se estableció un criterio para la transformación de las abundancias relativas en las variables discretas, de modo que:

- Valores de 0: ausencia del producto.
- Valores de 0-1: presencia escasa.
- Valores de 1-2: presencia moderada.
- Valores de 2-3: presencia abundante.
- Valores de 4: presencia muy abundante.

Con los dos tipos de variables expuestos, se han establecido los siguientes análisis:

1. Análisis univariante. Son ensayos de comparación de medias a través de un modelo de variable simple, por el que se pretende conocer si hay diferencias significativas para cada uno de los productos entre las tres especies.

Se ha empleado la técnica del análisis de varianza (modelo jerárquico simple), a pesar de que el tipo de datos incumple parcialmente las exigencias de esta técnica de análisis.

2. Análisis multivariante. Se han agrupado las variables por afinidad química, para intentar, por medio de técnicas de análisis multivariante (análisis canónico de correspondencias, Canoco (TER BRAK, 1987)), detectar si es posible discriminar, de forma eficiente, las distintas especies en estudio.

La tabla IX.1 reúne las asociaciones de variables,



establecidas según la afinidad química de los componentes de los extractos de madera, corteza y hojas, que se han sometido a análisis multivariante. Los componentes se nombran por el número de su pico cromatográfico.

Tabla IX.1: Distribución de los componentes químicos para el análisis multivariante.			
	Madera	Corteza	Hojas
Acidos y aldehídos fenólicos	1,4,5,6,7,11	1,2,3a,4,5,6,9	1,2,3,8
Elagitaninos	11,13a,14,15,16b,17,19	9,12,13,14a,18a,21a,21	4,11a,13a,15a,20b
Flavonoles	13b,16a,17a	10,14,18,19	<p>Grupo 1: 13d,16,17,17b,20,22b</p> <p>Grupo 2: 5,6,7,9,10,11,12</p> <p>Grupo 3: 5,6,7,9,10,11,13d</p> <p>Grupo 4: 12,17,22b</p> <p>Grupo 5: 7,9,10,11,12,13d,16,17b,20,22b</p>
Flavanonas	8,12,16,18,20	7,8,11,15,16,20	14a,14b,16a,22a

Como se observa en el cuadro anterior, se han establecido unos grupos generales de ácidos y aldehídos fenólicos, elagitaninos y flavanonas, tanto en madera como en corteza y hojas. Sin embargo, hemos considerado conveniente tratar de forma fraccionada el grupo de flavonoles de las hojas, por ser un grupo muy abundante y con una amplia diversidad estructural. Por ello, los flavonoles de hojas se han agrupado según:

- Grupo 1: aglicones de flavonol
- Grupo 2: glicósidos de flavonol
- Grupo 3: quercetina y sus glicósidos
- Grupo 4: kaempferol y sus derivados

- Grupo 5: asociación de variables de los grupos anteriores, que presentaron diferencias notables en el análisis univariante.

Además, se han establecido otros agrupamientos entre las variables que representan los componentes de los aceites esenciales de las hojas:

- Terpenos 1:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, limoneno, 1,8-cineol, pinocarvona, *trans*-pinocarveol.

- Terpenos 2: *p*-cimeno, criptona, terpinen-4-ol, acetato de  $\alpha$ -terpinilo,  $\alpha$ -terpineol, cuminaldehído.

- Terpenos 3: viridiflorol, globulol, espatulenol.

- Terpenos 4: agrupación de componentes terpénicos que, en el análisis univariante, han presentado diferencias significativas entre especies, es decir,  $\beta$ -pineno, mirceno, *p*-cimeno, criptona, cuminaldehído, globulol.

## **X. RESULTADOS Y DISCUSION**

## **X. RESULTADOS Y DISCUSION**

La exposición de los resultados obtenidos y su discusión se va a desglosar en tres bloques, cada uno de los cuales corresponde a una de las tres especies estudiadas: *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*.

### **1. EUCALYPTUS CAMALDULENSIS DEHNH.**

#### **1.1. CARACTERIZACION DE LAS MUESTRAS**

##### **1.1.1. Caracterización de hojas. Análisis de aceites esenciales**

La tabla X.1.1 muestra los resultados de los análisis de los aceites esenciales de las hojas de *E. camaldulensis*. En ella, la concentración de cada componente se expresa en porcentaje de área del pico cromatográfico correspondiente. En esta tabla se incluyen asimismo los rendimientos de destilación, expresados también en porcentaje (V/P), referido al peso de muestra seca. De igual forma, en la figura X.1.1 se representan los cromatogramas de muestras tipo de *E. camaldulensis*. Las condiciones de destilación y de análisis de los aceites esenciales se expusieron en el apartado III.2.1.

A parte de los resultados publicados por PENFOLD y WILLIS (1961), los datos conocidos sobre la composición de los aceites esenciales de *E. camaldulensis*, corresponden a dos muestras, de India (SINGH y SINHA, 1981) y Marruecos (ZRIRA y BENJILALI, 1991). Estos aceites tienen, como principales componentes, *p*-cimeno y 1,8-cineol. Las diferencias entre estas muestras se basan en la concentración del 1,8-cineol y en la presencia o ausencia de cuminaldehído y felandral.

Tabla X.1.1: Composición de los aceites esenciales de hojas de  
*Eucalyptus camaldulensis*

Pico	Componente	Concentración (%)						
		HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	$\alpha$ -Pineno	1,3	1,1	0,9	2,9	2,3	1,3	1,0
2	$\beta$ -Pineno	5,2	0,2	t	8,3	6,9	0,2	t
3	Mirceno	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	8,5	11,4
4	Limoneno	0,9	1,8	1,0	1,4	0,9	0,5	0,6
5	$\beta$ -Felandreno	0,2	0,7	0,7	0,5	1,1	1,0	1,4
6	1,8-cineol	2,1	2,1	2,1	2,7	2,2	0,8	1,5
7	$\gamma$ -Terpineno	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,5	0,4
8	p-Cimeno	24,2	40,6	43,6	34,7	38,5	28,1	27,8
9	Linalol	0,1	0,2	t	0,2	0,1	0,9	0,8
10	Ester	0,6	0,6	0,4	0,5	0,4	0,1	0,2
11	Pinocarvona	1,0	t	0,1	1,0	0,7	t	0,1
12	$\beta$ -Cariofileno	0,1	0,3	0,3	0,3	0,4	1,4	1,8
13	Aromadendreno	0,6	0,1	0,2	0,4	0,4	t	t
14	Terpinen-4-ol	2,1	2,7	1,5	2,5	2,1	0,8	1,2
15	Mirtenal	2,2	t	t	1,9	1,7	t	t
16	Alloaromadendreno	0,5	1,0	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3
17	trans-Pinocarveol	3,6	0,2	0,2	2,6	2,2	0,3	0,3
18	Criptona	12,4	12,2	12,9	10,8	13,9	0,6	0,2
19	$\alpha$ -Terpineol	1,8	1,8	0,7	2,3	0,8	1,6	0,6
20	Felandral	1,3	2,4	3,7	2,3	3,2	0,2	0,2
21	Alcohol monoterpénico	0,9	0,7	0,4	0,5	0,4	0,2	0,1
22	Cuminaldehído	3,6	4,8	5,3	3,9	5,3	0,1	0,2
23	Mirtenol	1,8	0,1	t	1,2	1,0	0,2	t
24	p-Cimen-8-ol	1,2	1,0	1,0	0,9	0,9	t	0,1
25	Alc. sesquiterpénico	0,1	t	0,1	0,2	t	0,4	0,7
26	Oxido cariofileno	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,4	1,7
27	Alc. sesquiterpénico	t	t	t	t	t	1,1	1,9
28	Alc. sesquiterpénico	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,6	1,0
29	Alc. sesquiterpénico	t	t	t	t	t	1,4	3,1
30	Viridiflorol	0,1	t	t	t	t	3,8	6,4
31	$\beta$ -Eudesmol	0,4	0,4	0,3	0,3	0,1	3,9	6,0
32	Ledol	t	t	t	t	t	1,4	2,2
33	Alcohol cumínico	1,0	0,7	0,8	0,6	0,8	t	t
34	Globulol	t	t	t	t	t	1,7	3,0
35	Espatulenol	15,3	16,0	13,7	7,0	6,0	20,0	11,4
36	Alc. sesquiterpénico	0,4	0,1	0,2	0,3	t	1,4	0,4
37	Timol	0,2	0,4	0,1	0,2	t	0,9	0,5
38	Carvacrol	0,7	0,9	0,7	0,6	0,7	0,7	0,5
39	$\alpha$ -Cadinol	1,1	0,8	1,1	0,7	0,7	2,4	2,1
Rendimiento (%)		0,86	1,14	0,62	0,82	0,91	0,12	0,16

H = Huelva, P = Pontevedra, EC = *E. camaldulensis*; t = trazas (<0,1 %).

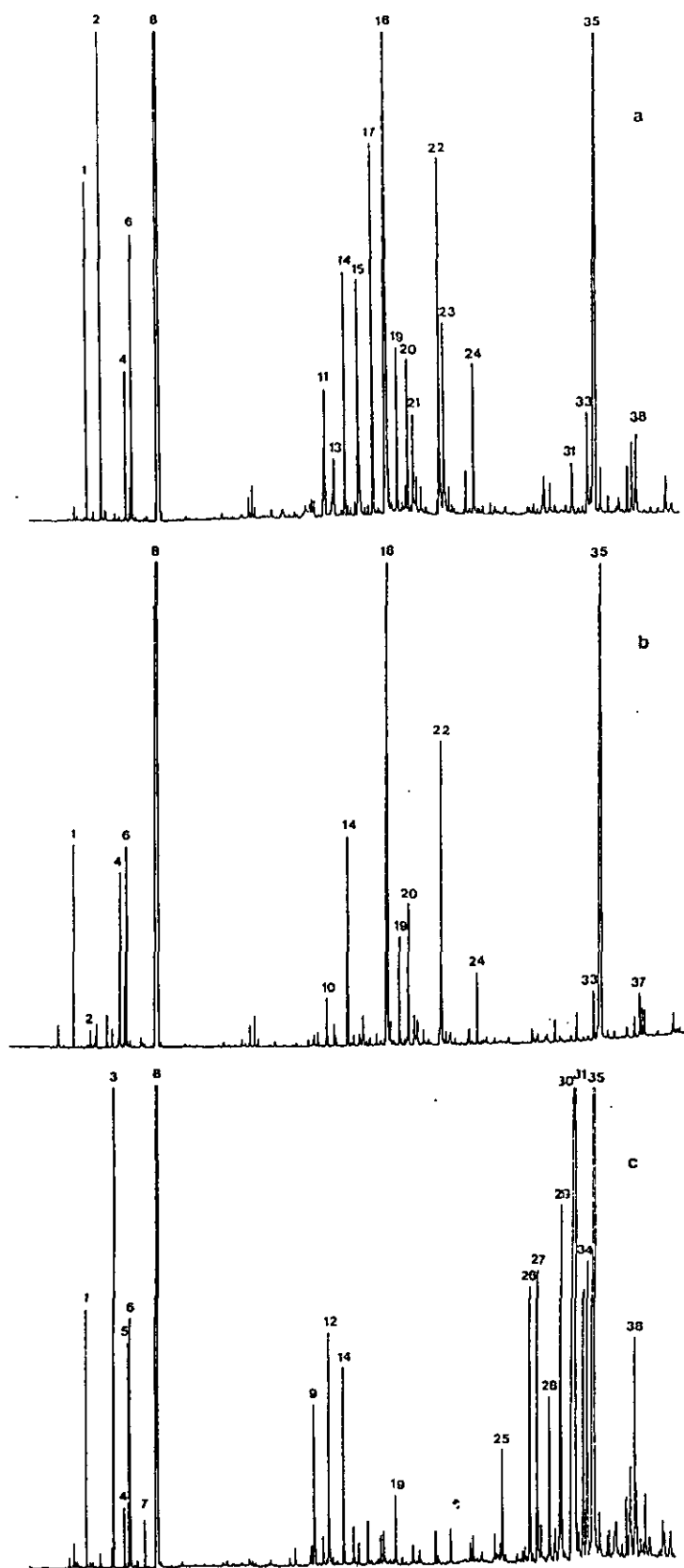


Figura X.1.1: Cromatogramas de aceites esenciales de *Eucalyptus camaldulensis*. a: muestra HEC1. b: muestra HEC2. c: muestra PEC2.

Se observa que las muestras, procedentes de Huelva proporcionan mayores rendimientos de aceite esencial que las recogidas en Pontevedra. Los componentes principales, en todas ellas, son *p*-cimeno (24,2-43,6 %, en Huelva y 27,8-28,2 %, en Pontevedra) y espatulenol (6,0-15,3 % en Huelva y 11,4-20,0 % en Pontevedra). Los aceites esenciales de Huelva difieren de los de Pontevedra: los primeros son ricos en criptona y cuminaldehído, y los últimos en mirceno y alcoholes sesquiterpénicos. Las muestras de Huelva pueden clasificarse en dos grupos, el primero de ellos compuesto por HEC1, HEC4 y HEC5, caracterizado por una mayor concentración de  $\beta$ -pineno, pinocarvona, mirtenal, *trans*-pinocarveol y mirtenol.

#### 1.1.2. Caracterización de maderas. Determinaciones químicas. Normas

La tabla X.1.2 reúne los resultados obtenidos en la aplicación, a las muestras de madera de *E. camaldulensis*, de los ensayos normalizados descritos en el apartado III.2.2., aplicados para la clasificación de las maderas según su aptitud para la obtención de pasta de celulosa. Estos ensayos corresponden a las determinaciones de humedad, cenizas, solubilidades en agua fría y caliente, y en sosa; de extractos en alcohol-benceno (1:2) y de los contenidos de ligninas, holocelulosa y pentosanos.

Los resultados de las distintas solubilidades, extractos en alcohol-benceno y cenizas, presentan rangos de variación más amplios que los descritos en la bibliografía (ALONSO AGUILAR, 1976; BUSTAMANTE EZPELETA y SANTOS VIQUEIRA, 1983), con valores máximos, considerablemente más altos. No ocurre lo mismo con lignina, holocelulosa y pentosanos, con rangos menores que los bibliográficos.

Tabla X.1.2: Análisis químico de maderas de <i>E. camaldulensis</i>							
Muestra	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
Extracto alcohol-benceno	3,78	3,99	5,10	5,61	4,38	1,18	1,44
Cenizas	0,98	1,08	0,71	0,67	0,89	0,37	0,21
Solubilidad agua fría	8,41	7,03	7,82	8,90	7,75	1,43	0,08
Solubilidad agua caliente	10,20	8,36	8,25	9,09	8,89	3,06	0,70
Solubilidad sosa	21,60	18,20	18,40	19,60	18,60	13,50	11,00
Holocelulosa	77,32	79,00	77,53	78,42	77,29	83,69	83,79
Ligninas	25,33	23,57	24,90	18,36	23,81	24,35	25,66
Pentosanos	18,75	19,67	15,79	19,18	19,36	17,80	16,19

H = Huelva, P = Pontevedra, EC = *E. camaldulensis*.

A continuación, discutimos, por separado, los resultados obtenidos para cada una de las determinaciones:

1. Extractos de alcohol-benceno. Las sustancias, extraídas con alcohol-benceno, son de naturaleza polifenólica, aceites, ácidos grasos y sus ésteres, y sustancias insaponificables. Estos compuestos pueden interferir la determinación de ligninas y alterar los procesos de producción de pasta de papel. Por ello, se puede establecer que un mayor contenido de extractos en alcohol-benceno implica peor calidad de la madera como productora de pasta. De acuerdo con estos resultados, las muestras de Huelva, con valores sensiblemente más altos que las de Pontevedra, presentan peores propiedades que estas últimas.

2. Cenizas. El contenido de cenizas tiene menor influencia que otras variables, sobre la calidad de la madera, como productora de pasta de papel. Se puede suponer que una mayor carga inorgánica (representada por una mayor cantidad de cenizas) puede estar relacionada con una peor calidad de la madera. Por ello, en consonancia con los resultados de los extractos en alcohol-benceno, las muestras de Huelva parecen menos apropiadas para la obtención de pasta de papel.



3. Solubilidades en agua fría y caliente. Un aumento en la cantidad de sustancias solubles en agua fría, o en agua caliente, representa una pérdida de rendimiento en pasta de papel. Como en los casos anteriores, las muestras de Huelva presentan mayores solubilidades, y, por ello, peores propiedades. Son notablemente bajos los valores que presenta la muestra PEC2, tanto para agua fría como para agua caliente.

4. Solubilidad en sosa. Las soluciones de álcali permiten extraer, en caliente, carbohidratos de bajo peso molecular, fundamentalmente, formados por hemicelulosas o celulosas degradadas. Por ello, valores mayores de solubilidad en sosa determinan menores porcentajes de celulosas de cadena larga, que contribuyen a la mejor calidad de la pasta. Confirmando los resultados de las anteriores variables, las maderas de Huelva presentan peores características, como productoras de pasta.

En algunos casos, la solubilidad en sosa puede indicar el grado de ataque por hongos, o de degradación por calor, luz, oxidación, etc., que experimenta una madera. Un aumento en el porcentaje de sustancias solubles en álcali, puede ser indicativo de cierta degradación de la madera. Esto podría explicar el elevado valor de solubilidad en sosa (21,6) que presenta la muestra HEC1.

5. Holocelulosa y pentosanos. Representan dos variables contrapuestas, en cuanto a su influencia en la calidad de la madera. Una madera será tanto más productiva, cuanto mayor sea su contenido de holocelulosa y menor, el de pentosanos. Por ello, confirmando los resultados anteriores, los contenidos de holocelulosa y pentosanos determinan mayor calidad de la madera de las muestras de Pontevedra.

6. Ligninas. La deslignificación es una de las etapas fundamentales en la producción de pasta de papel. Cuanto

mayor es el contenido en ligninas, más difícil resulta el proceso y, por ello, peor es la calidad de la madera. Esta es la única variable en la cual no se manifiestan diferencias considerables entre las maderas de Huelva y las de Pontevedra.

### 1.1.3. Conclusiones

1. De acuerdo con los análisis de aceites esenciales de las hojas, las muestras de *E. camaldulensis* pueden clasificarse en dos grupos: las de Huelva, ricas en criptona y cuminaldehído, y las de Pontevedra, ricas en mirceno y alcoholes sesquiterpénicos. A su vez, las de Huelva se clasifican en dos grupos: HEC1, HEC4 y HEC5, por un lado; y HEC2, HEC3 por otro. El factor diferenciador es la alta concentración de pinocarvona, mirtenal, *trans*-pinocarveol y mirtenol en el primer grupo de muestras.

2. Las determinaciones químicas normalizadas de las muestras de madera permiten establecer dos grupos: el primero, constituido por las muestras de Pontevedra, presentan mejores propiedades para la producción de pasta de papel; el segundo, constituido por las de Huelva, presenta peores propiedades, a excepción del contenido de ligninas.

### 1.2. EXTRACCION. VALORACION DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN LOS EXTRACTOS

En el apartado de puesta a punto de los métodos de extracción, se describen los diversos ensayos realizados con distintos tiempos, temperaturas y disolventes. De todos ellos, se seleccionó, como método definitivo, la extracción con MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20) a temperatura ambiente, durante 24 h, con una etapa posterior de extracción con éter etílico.

Para determinar el contenido polifenólico de los extractos, se aplicó el método de Folin-Ciocalteu, de la valoración de

fenoles totales, como se ha descrito en el apartado de valoraciones cuantitativas (VIII.1.1.).

Las tablas X.1.3, X.1.4 y X.1.5 recogen los valores de los rendimientos de los extractos globales en MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20), y en éter; y, los del contenido de fenoles totales para las muestras de madera, corteza y hojas de *E. camaldulensis*, referidos a peso de muestra seca.

### 1.2.1. Madera

Tabla X.1.3: Rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales de las muestras de madera de <i>E. camaldulensis</i>			
Muestra	Extracto en MeOH-H <sub>2</sub> O (%)	Extracto en éter etílico (%)	Fenoles totales mg(c.q.)/g (*)
HEC1	10,03	0,41	20,60
HEC2	3,51	0,22	9,73
HEC3	8,07	0,29	11,77
HEC4	8,48	0,33	17,91
HEC5	7,14	0,36	25,63
PEC1	2,40	0,25	6,29
PEC2	2,84	0,13	5,22

H = Huelva, P = Pontevedra, EC = *E. camaldulensis*; (\*) c.q.= calculado en quercetina.

Los rendimientos de la extracción metanólica y la etérea son mayores en las muestras de Huelva, que en las de Pontevedra, a excepción de la muestra HEC2, más semejante a las de Pontevedra. Los contenidos en fenoles totales presentan el mismo comportamiento.

Parece existir cierta proporcionalidad entre rendimiento global y rendimiento etéreo; y, a su vez, entre ambos y contenido en fenoles. No obstante, la muestra HEC5 incumple esta regla, porque presenta valores muy elevados de rendimiento etéreo y de contenido en fenoles totales, en relación con su rendimiento global.

### 1.2.2. Corteza

Tabla X.1.4: Rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales de las muestras de corteza de <i>E. camaldulensis</i>			
Muestra	Extracto en MeOH-H <sub>2</sub> O (%)	Extracto en éter etílico (%)	Fenoles totales mg(c.q)/g (*)
HEC1	18,22	0,88	85,97
HEC2	8,73	0,60	49,40
HEC3	36,16	1,08	190,91
HEC4	3,69	0,65	17,23
HEC5	22,61	0,87	114,60
PEC1	2,77	0,94	2,15
PEC2	2,87	0,93	2,91

H = Huelva, P = Pontevedra, EC = *E. camaldulensis*; (\*) c.q. = calculado en quercetina.

Al comparar las muestras de Huelva con las de Pontevedra, se observa que las primeras presentan valores más altos de rendimientos globales de extracción y de contenido en fenoles totales, si bien, la variabilidad de valores entre las distintas muestras de Huelva es elevadísima.

Aunque los rendimientos globales de extracción y el contenido de fenoles manifiestan relación de proporcionalidad, no ocurre así con el rendimiento etéreo. Por ejemplo, las muestras de Huelva, cuyos rendimientos globales y contenidos en fenoles son los más altos entre todas las muestras, presentan valores bajos de rendimiento etéreo. La proporcionalidad entre extracto en metanol-agua y contenido en fenoles totales será debida, probablemente, a que la máxima contribución al contenido en fenoles totales proceda de los polifenoles poliméricos del tipo de taninos, que se extraen, de las cortezas, con la mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20), pero no pasan a la fase etérea.

### 1.2.3. Hojas

Tabla X.1.5: Rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales de las muestras de hojas de <i>E. camaldulensis</i>			
Muestra	Extracto en MeOH-H <sub>2</sub> O (%)	Extracto en éter etílico (%)	Fenoles totales mg(c.q.)/g (*)
HEC1	36,32	2,18	85,67
HEC2	32,86	2,16	73,51
HEC3	41,21	1,89	74,09
HEC4	36,62	2,52	94,27
HEC5	36,23	1,84	92,38
PEC1	21,41	0,51	45,69
PEC2	26,70	0,38	36,57

H = Huelva, P = Pontevedra, EC = *E. camaldulensis*; (\*) c.q. = calculado en quercetina.

Los extractos de hojas presentan rendimientos globales mayores que los de madera y corteza. Como en los casos anteriores, las muestras de Huelva dan valores mayores que las de Pontevedra. Sin embargo, los de aquéllas de hojas de Huelva resultaron menos variables que los de madera y corteza de la misma procedencia.

Considerando de forma global las muestras de Huelva, por un lado, y las de Pontevedra, por otro, parece existir proporcionalidad entre rendimiento de extracto total, rendimiento de extracto etéreo y contenido en fenoles totales. Sin embargo, si se analizan individualmente los resultados de las tres variables, para cada una de las muestras, la relación no se cumple de forma estricta.

### 1.2.4. Conclusiones

1. De las tres partes de la planta analizadas, las hojas presentan mayores rendimientos de extractos globales y de extractos etéreos, y las maderas, los más bajos.

2. Las cortezas presentan una elevadísima dispersión en los

valores de las tres variables analizadas. Esto es evidente especialmente para los valores de extracto en metanol-agua y para el contenido en fenoles totales, donde se han encontrado los valores máximos y mínimos de todas las muestras de las distintas partes del árbol.

3. Los elevados valores de los contenidos en fenoles totales en algunas muestras de cortezas, pueden ser debidos a altos contenidos de taninos.

4. En conjunto, no se puede concluir que exista una relación de proporcionalidad entre las tres variables analizadas.

5. Considerando globalmente las muestras de Huelva y las de Pontevedra, las primeras presentan valores más altos para las tres variables determinadas.

### 1.3. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Como se ha descrito en el apartado de puesta a punto de la técnica de cromatografía en capa fina, se eligió como método definitivo la cromatografía bidimensional, sobre placas de celulosa. El desarrollo se realizó con  $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$  (4:1:5), para la primera dimensión, y con AcOH al 30 %, para la segunda. El revelado se llevó a cabo con el reactivo A de Neu y polietilenglicol.

Antes de exponer los resultados de los análisis, por CCF, de los extractos, conviene repetir algunas consideraciones sobre ésta técnica:

1. Puesto que disponemos de técnicas analíticas más sensibles y específicas que la CCF, únicamente consideramos esta técnica como apoyo a los análisis realizados por otros métodos.

2. Las identificaciones realizadas, mediante CCF, no se

consideran definitivas, sino sólo una aproximación que necesita confirmación por otras técnicas.

3. Aunque muchos autores han llevado a cabo valoraciones semicuantitativas por CCF, atendiendo al tamaño y la intensidad de las manchas cromatográficas, nosotros nos limitamos a señalar la presencia o ausencia de componentes, realizando las valoraciones mediante otras técnicas.

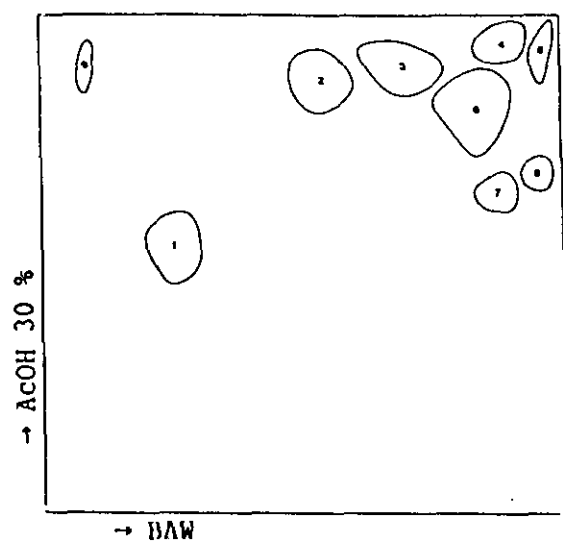
A continuación, se exponen los resultados de los análisis, por CCF, de las fracciones solubles en éter de los extractos en MeOH-H<sub>2</sub>O, de madera, corteza y hojas de *E. camaldulensis*. Se incluyen figuras de cromatoplasmas modelo, valores de R<sub>f</sub> y coloración de las manchas correspondientes a los componentes detectados en las distintas muestras.

#### 1.3.1. Madera

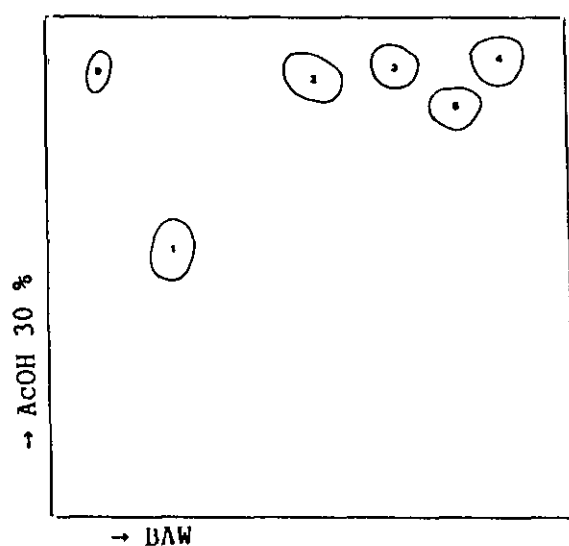
Las cromatoplasmas modelo de los extractos etéreos de madera de *E. camaldulensis* se representan en la figura X.1.2. La tabla X.1.6 reúne los valores de R<sub>f</sub> y las coloraciones, bajo luz UV y tras el revelado con reactivo A de Neu de las distintas manchas, así como su posible identificación.

Tabla X.1.6: Componentes detectados en las placas de CCF de los extractos etéreos de madera de <i>E. camaldulensis</i>					
Mancha Nº	R <sub>f</sub>		Color UV	Revelado React.A+PEG	Posible identificación
	1ª Dim.	2ª Dim.			
1	0,42	0,18	Am-Az	Am-Az	Ac. elágico
2	0,87	0,50	Am-Az	Am-Az	Elagitanino
3	0,88	0,67	Az	Az	Elagitanino
4	0,89	0,87	Am	Am	Ac. o Ald. fenólico
5	0,92	0,96	Ma-Mo	Mo	Vainillina
6	0,80	0,80	Ma-Mo	Ma-Mo	Ac. o Ald. fenólico
7	0,59	0,88	Am	Am	Ac. o Ald. fenólico
8	0,61	0,96	Az	Az	Ac. o Ald. fenólico
9	0,90	0,02	-	-	*

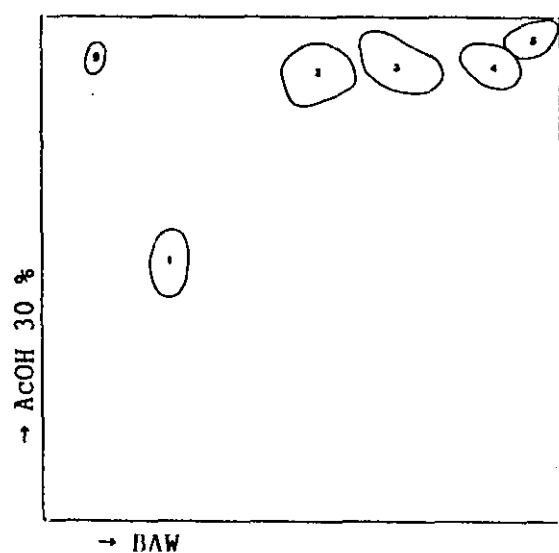
Am = amarillo, Az = azul, Ma = marrón, Mo = morado; \* = no identificado.



a



b



c

Figura X.1.2: Cromatoplasas bidimensionales de extractos etéreos de madera de *E. camaldulensis*. a: HEC1. b: HEC3. c: PEC1.



La mancha 9 se detecta en luz visible y con intensidad muy débil.

Unas manchas han sido identificadas por comparación con patrones (ácido elágico y vainillina). Otras, al observar su coloración y posición en la placa, han sido atribuidas a un determinado grupo de polifenoles (ácidos y aldehídos fenólicos). Finalmente, hemos identificado algunas manchas por la semejanza de su coloración con la del ácido elágico. Como este último grupo de compuestos no es objeto directo de nuestro estudio y no disponemos de información sobre su comportamiento cromatográfico, no podemos confirmar estas identificaciones.

En la tabla X.1.7 se recoge la información relativa a la presencia o ausencia de cada componente en las muestras de madera de *E. camaldulensis*.

Tabla X.1.7: Distribución de los componentes detectados por CCF en los extractos etéreos de madera de <i>E. camaldulensis</i>								
Nº	Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	Ac. elágico	+	+	+	+	+	+	+
2	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+
3	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+
4	Ac. o Ald. fenólico	+	+	+	+	+	+	+
5	Vainillina	+	+	+	+	+	+	+
6	Ac. o Ald. fenólico	+	-	+	+	+	-	-
7	Ac. o Ald. fenólico	+	-	-	+	+	-	-
8	Ac. o Ald. fenólico	+	-	-	+	+	-	-
9	*	+	+	+	+	+	+	+

H = Huelva, P = Pontevedra, EC = *E. camaldulensis*.

+ = presencia, - = ausencia; \* = no identificado.

La distribución de manchas pone de manifiesto un mayor contenido de ácidos y aldehídos fenólicos en las muestras HEC1, HEC4 y HEC5. Es la diferencia más característica de sus extractos.

### 1.3.2. Corteza

La figura X.1.3 contiene las cromatoplasmas modelo de los extractos etéreos de corteza de *E. camaldulensis*.

La tabla X.1.8 reúne las características de las manchas ( $R_f$ , coloraciones en UV y tras el revelado), así como su posible identificación.

Tabla X.1.8: Componentes detectados en las placas de CCF de los extractos etéreos de corteza de <i>E. camaldulensis</i>					
Mancha Nº	$R_f$		Color UV	Revelado React.A+PEG	Posible identificación
	1ª Dim.	2ª Dim.			
1	0,48	0,17	Am-Az	Az	Ac. elágico
2	0,73	0,11	Az	Az	Elagitanino
3	0,92	0,01	-	Am	*
4	0,83	0,14	-	Am	Flavonol
5	0,86	0,29	-	Am	Quercetina
6	0,88	0,68	Am	Am	Flavanona
7	0,78	0,80	Ma	Ma-Mo	Ac. fenólico
8	0,72	0,86	-	Am	Flavanona
9	0,89	0,94	-	Am	Ac. o Ald. fenólico

Am = amarillo, Az = azul, Ma = marrón, Mo = morado; \* = no identificado.

A la identificación definitiva del ácido elágico y vainillina, se añade ahora la de quercetina.

Se ha detectado la presencia de unos componentes cuya coloración y posición inducen a pensar que pertenecen a los grupos de flavonoles y flavanonas.

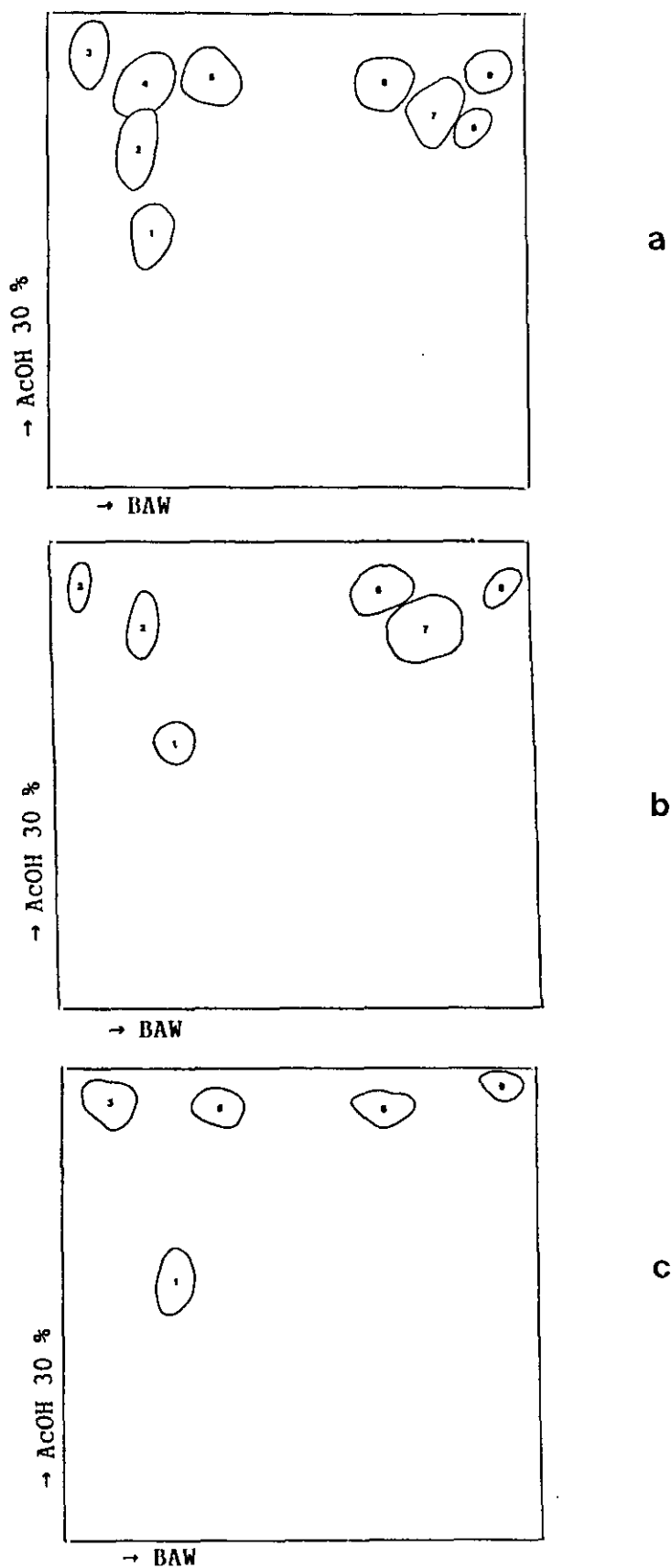


Figura X.1.3: Cromatoplasmas de extractos etéreos de cortezas de *E. camaldulensis*. a: HEC1. b: HEC3. c: PEC1.

En la tabla X.1.9 se recoge la distribución de cada los componentes en las distintas muestras.

Tabla X.1.9: Distribución de los componentes detectados por CCF en los extractos etéreos de corteza de <i>E. camaldulensis</i>								
Nº	Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	Ac. elágico	+	+	+	+	+	+	+
2	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	-
3	*	+	+	+	+	+	+	+
4	Flavonol	+	+	+	-	+	-	-
5	Quercetina	+	+	+	+	+	-	-
6	Flavanona	+	+	+	-	+	-	-
7	Ac. fenólico	+	+	+	+	+	+	+
8	Flavanona	+	+	+	-	-	-	-
9	Ac. o Ald. fenólico	+	+	+	+	+	+	+

H = Huelva, P = Pontevedra, EC = *E. camaldulensis*

+ = presencia, - = ausencia; \* = no identificado

De los resultados, presentados en la tabla anterior, se puede deducir que el patrón cromatográfico de las muestras de Huelva es, en general, distinto del de las de Pontevedra. Las primeras son bastante más complejas, con presencia de compuestos fenólicos de diversos grupos funcionales: ácidos y aldehidos fenólicos y flavonoides (flavonoles y flavanonas). Sin embargo, las muestras de Pontevedra parecen más ricas en ácidos fenólicos y elagitaninos, con ausencia de flavonoides. Dentro de las muestras de Huelva, la HEC4 presenta un patrón más pobre que las demás.

### 1.3.3. Hojas

La figura X.1.4 contiene las cromatoplasmas modelo de extractos etéreos de hojas de *E. camaldulensis*.

La tabla X.1.10 reúne los valores de los  $R_f$  y las coloraciones de las distintas manchas bajo luz UV y tras el revelado con reactivo A de Neu, así como su posible identificación.

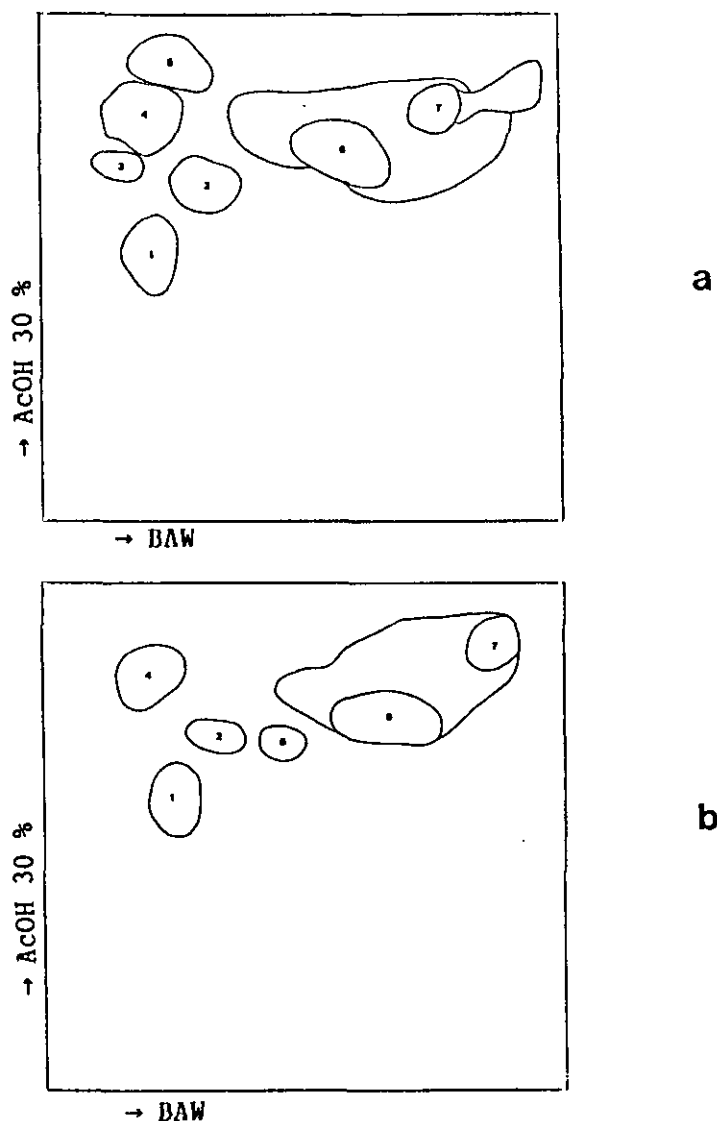


Figura X.1.4: Cromatoplasmas de extractos etéreos de hojas de *E. camaldulensis*. a: HEC1. b: PEC1.

Tabla X.1.10: Componentes detectados en las placas de CCF de los extractos etéreos de hojas de <i>E. camaldulensis</i>					
Mancha Nº	Rf		Color UV	Revelado React.A+PEG	Posible identificación
	1ª Dim.	2ª Dim.			
1	0,48	0,18	Az	Az	Ac. elágico
2	0,63	0,27	-	Am	Flavonol
3	0,65	0,08	-	Am	Flavonol
4	0,79	0,11	-	Am	Flavonol
5	0,88	0,18	-	Am	Flavonol
6	0,70	0,58	Am	Am-Na	Flavonol
7	0,83	0,80	Am	Am	Flavonol
8	0,62	0,42	-	Am	Flavonol

Am = amarillo, Az = azul, Ma = marrón; Mo = morado

Como se aprecia en las cromatoplasmas y la tabla de identificaciones, el patrón de composición de los extractos de hojas es completamente distinto al de madera y corteza. Los extractos etéreos de hojas están compuestos por ácido elágico, característico del género *Eucalyptus*, y por una amplia variedad de flavonoles.

Por su posición cromatográfica, podría deducirse que 2, 3, 4, 5, son aglicones de flavonol. Las amplias manchas atribuidas a los componentes 6 y 7 se encuentran localizadas en la zona de los glicósidos y, por su coloración, cabe pensar que se trata de glicósidos de flavonol, probablemente de la quercetina. En algunos casos, esas amplias manchas no se resuelven bien, por lo que cabe esperar que están formadas por más de un compuesto.

La mancha 8 se encuentra en la zona límite entre los glicósidos y los aglicones. Nos inclinamos a pensar que se puede tratar de algún monoglicósido de la quercetina.

En la tabla X.1.11 se representa la distribución de estos compuestos en los extractos etéreos de las muestras de hojas de *E. camaldulensis*.

Tabla X.1.11: Distribución de los componentes detectados por CCF en los extractos etéreos de hojas de <i>E. camaldulensis</i>								
Nº	Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	Acido elágico	+	+	+	+	+	+	+
2	Flavonol	+	+	+	+	+	+	+
3	Flavonol	+	+	+	+	+	-	-
4	Flavonol	+	+	+	+	+	+	+
5	Flavonol	+	-	-	+	-	-	-
6	Flavonol	+	+	+	+	+	+	+
7	Flavonol	+	+	+	+	+	+	+
8	Flavonol	-	-	-	-	-	+	+

H = Huelva, P = Pontevedra, EC = *E. camaldulensis*  
 + = presencia, - = ausencia

Es posible que la baja resolución y la sensibilidad de la CCF esté limitando la detectabilidad de algunos componentes, e,

incluso, que nos lleve a falsas conclusiones sobre semejanza entre muestras. Por ello, no consideramos las siguientes conclusiones como definitivas, hasta tener los resultados de los análisis por CLAR.

#### 1.3.4. Conclusiones

El análisis por CCF de los extractos etéreos de madera, corteza y hojas de *E. camaldulensis* permite extraer las siguientes conclusiones:

1. Los extractos de madera están compuestos, principalmente, por ácidos y aldehídos fenólicos y por elagitaninos. Las muestras más ricas en ácidos y aldehídos son HEC1, HEC4 y HEC5. Marcan una diferencia con las restantes.
2. Las muestras de corteza son más complejas en cuanto a variedad de componentes. En los extractos de las muestras de Huelva se detectan diversos flavonoides, mientras que las de Pontevedra son ricas en ácidos fenólicos y elagitaninos, con ausencia de flavonoides.
3. Los extractos de hojas son completamente diferentes a los de madera y corteza. Se caracterizan por distribuciones más o menos complejas de flavonoles, acompañadas por el ácido elágico.

#### 1.4. ANALISIS POR CLAR. IDENTIFICACIONES POR CLAR Y CG-EM

En este apartado, se reúnen los resultados de la aplicación de la CLAR a los extractos etéreos de madera, corteza y hojas. Se describen las identificaciones directas, realizadas mediante esta técnica, gracias al empleo de detectores de fotodiodos, que posibilitan la obtención del espectro UV-VIS del compuesto problema y su comparación con librerías de espectros. Cuando se ha dispuesto de patrones, se han comparado los comportamientos cromatográficos y los espectros del patrón y del problema. La

identificación se ha completado mediante el método de enriquecimiento del pico y el análisis cromatográfico de la muestra enriquecida, aplicando distintos gradientes de eluyente.

Se desarrollan también en este apartado las valoraciones semicuantitativas realizadas por CLAR.

Asimismo, se incluyen las identificaciones más complejas que han requerido la aplicación de técnicas de apoyo, como la cromatografía de gases-espectrometría de masas.

#### 1.4.1. Madera

##### A) Identificaciones

La figura X.1.5 muestra cromatogramas modelo de extractos etéreos de muestras de madera de *E. camaldulensis*.

Los componentes identificados directamente por CLAR en las muestras de madera de *E. camaldulensis* son:

- Ácido gálico (1)
- Ácido vainílico (4)
- Vainillina (5)
- Aldehído siríngico (6)
- Ácido elágico (11)
- Naringenina (16)

También se han reconocido por su espectro UV algunas flavanonas (picos 8, 12, 18 y 20), aunque no ha sido posible identificarlas con precisión. Se han encontrado casi siempre en baja concentración.

Otro grupo de componentes, reconocido por su espectro UV, son los elagitánicos. Al tratarse de derivados del ácido elágico, en particular, de ésteres del ácido elágico con azúcares, su espectro UV es prácticamente idéntico al del ácido, con dos



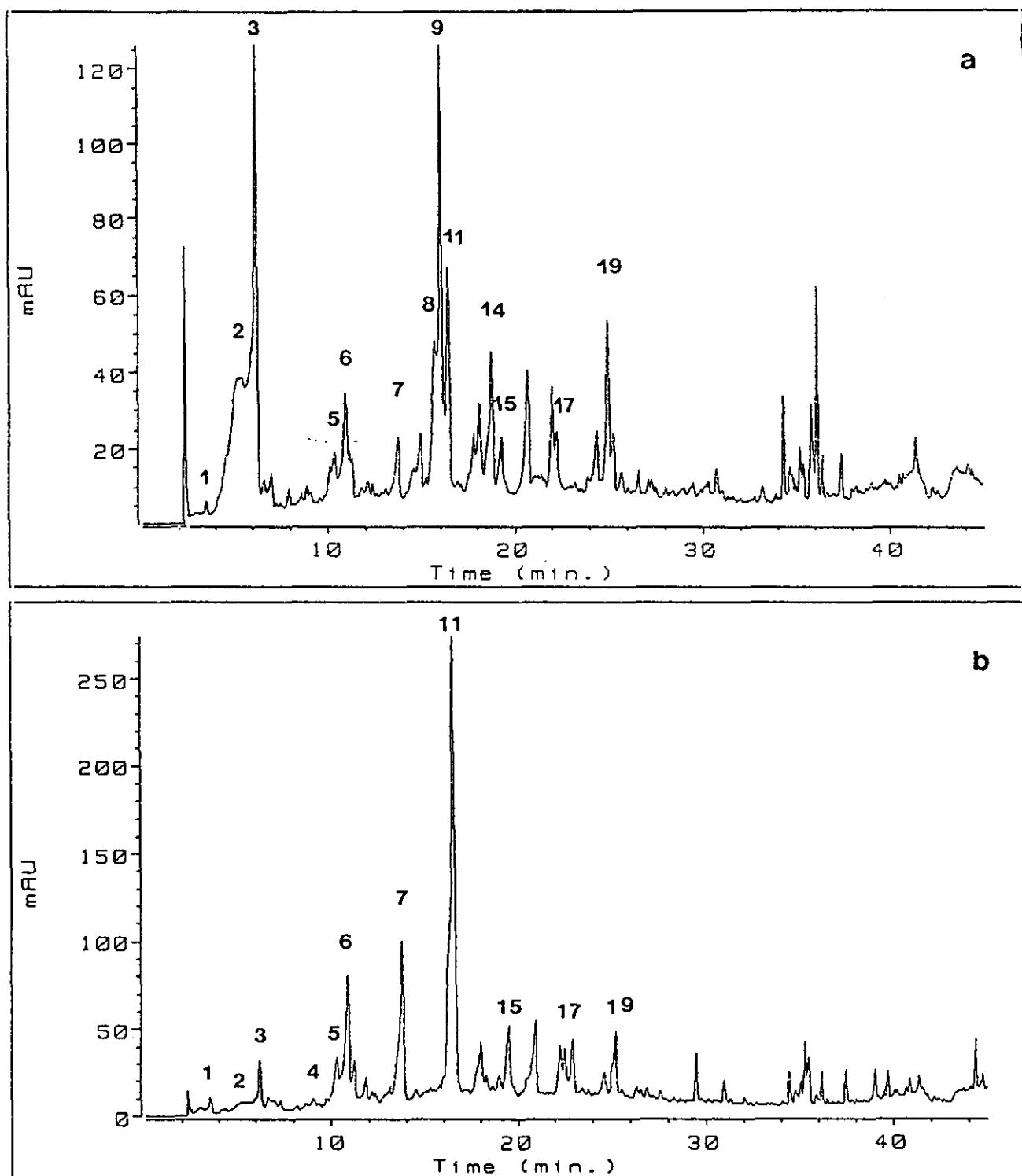


Figura X.1.5: Cromatogramas de extractos etéreos de madera de *E. camaldulensis*. a: HEC1. b: HEC2. (Absorbancia a  $325 \pm 75$  nm).

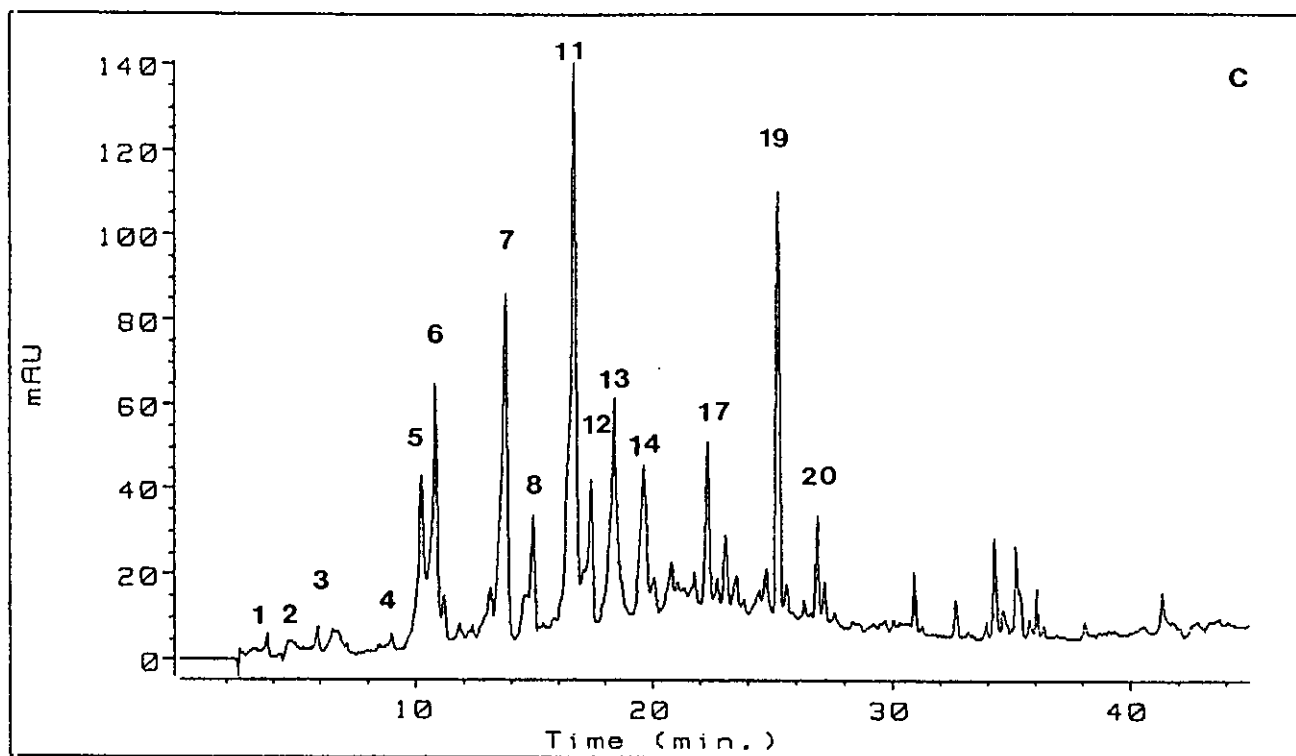


Figura X.1.5 (Cont.): Cromatogramas de extractos etéreos de madera de *E. camaldulensis*. c: PEC2. (Absorbancia a  $325 \pm 75$  nm).

máximos, a 253 y 365 nm. No se ha considerado objeto de este estudio la identificación del tipo de azúcar, ni de la posición de unión al ácido.

#### \* Identificación del pico 7

Consideramos conveniente profundizar en la identificación del pico 7, por tratarse de uno de los componentes mayoritarios los extractos de madera. El aislamiento y purificación de este compuesto se realizó a partir de una muestra de *E. globulus* (PEG1), por ser ésta la que presentaba mayor concentración del pico 7. Sin embargo, hemos considerado más adecuado desarrollar la identificación en este apartado, para poder, a partir de ahora, referirnos a este componente con su identificación precisa.

Se aisló este componente de los extractos de madera, por cromatografía líquida semipreparativa.

Los datos de que se disponía sobre este componente eran:

- Espectro UV-VIS: presenta un máximo de absorción a 343 nm. Aunque no coincide con ninguno de la librería de espectros, creada por nosotros, su forma parecía recordar a los del ácido y aldehído siríngico, con un desplazamiento del máximo de absorción respecto a los de estos compuestos (273 nm, para el ácido; 309 nm, para el aldehído; y 343 nm, para el compuesto problema) (ver figura X.1.6). En una primera aproximación, podría pensarse que se trataba del alcohol derivado del ácido y del aldehído siríngico.

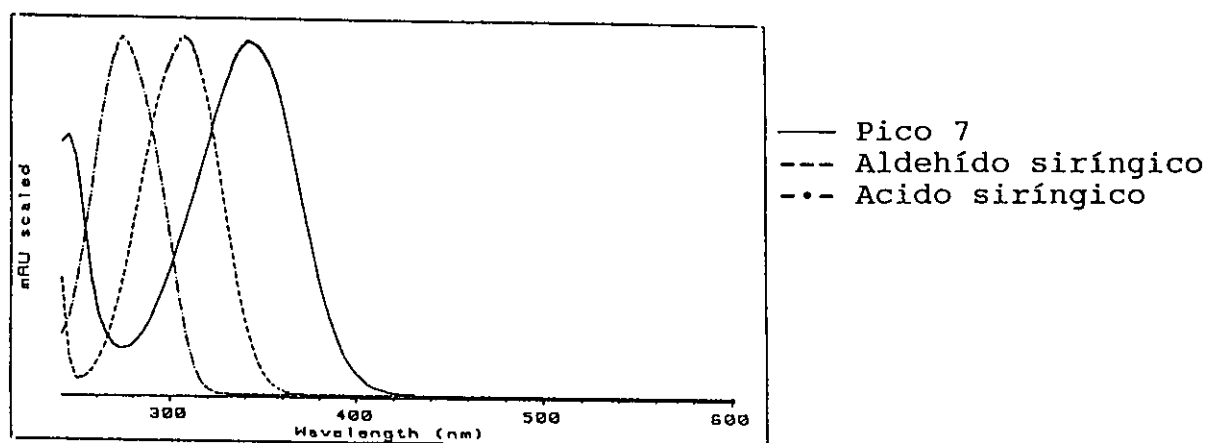


Figura X.1.6: Espectros UV del ácido siríngico, aldehído siríngico y pico 7 de los cromatogramas de los extractos étereos de madera.

-  $t_R$ . En las condiciones habituales de trabajo (ver apartado VI.4.3.), el  $t_R$  del pico 7 es de 13,78 min. Este valor es superior a los  $t_R$  del ácido y del aldehído siríngico (8,64 y 10,60 min). Este dato no está de acuerdo con la hipótesis del alcohol siríngico, que debería presentar un  $t_R$  menor, en las condiciones de trabajo aplicadas.

Se analizó este compuesto por cromatografía de gases-espectrometría de masas. El espectro obtenido muestra un elevado índice de semejanza (95) con el del 2,6-dimetoxifenol (figura X.1.7).

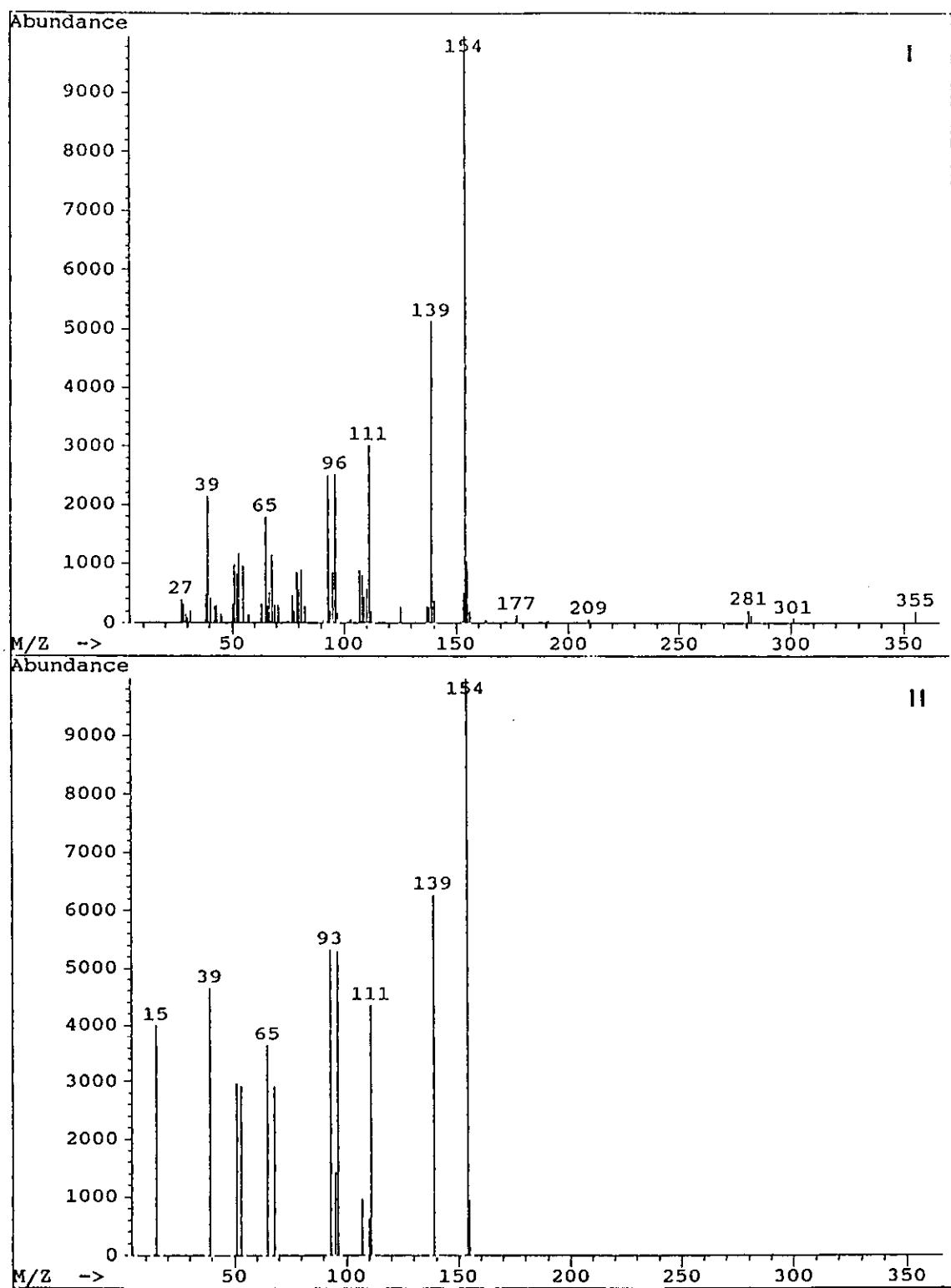


Figura X.1.7: Espectros de masas del pico 7 (I) y del 2,6-dimetoxifenol (II).

Este resultado hizo que descartásemos nuevamente la idea del alcohol siríngico, y que considerásemos la posibilidad de que la estructura del compuesto del pico 7 correspondiera al 2,6-dimetoxifenol.

Al disponer del patrón del 2,6-dimetoxifenol (Sigma), se preparó una disolución metanólica del mismo, que se analizó por CLAR en las condiciones habituales. El espectro UV presentaba un máximo a 269 nm (ver figura X.1.8) y el  $t_R$  era de 11,7 min, resultados que no coincidían en absoluto con las características del compuesto problema.

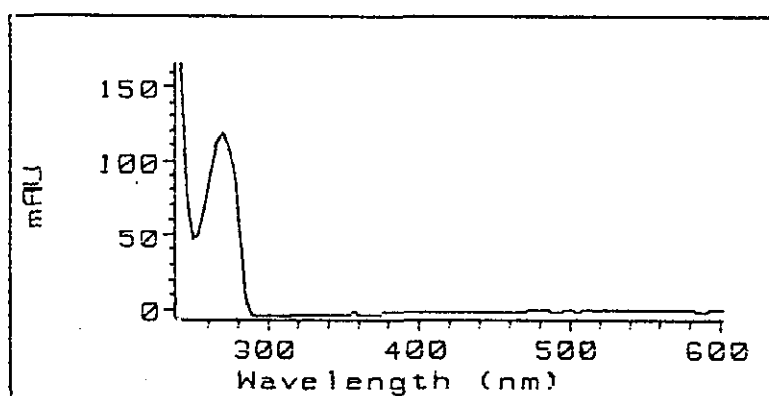


Figura X.1.8: Espectro UV del 2,6-dimetoxifenol.

El análisis, por CG-EM, del patrón de 2,6-dimetoxifenol da un  $t_R$ , diferente al del compuesto problema.

De acuerdo con estos resultados, suponemos que el compuesto problema es un derivado del ácido o del aldehído siríngico, pero no el alcohol siríngico. Este compuesto debe experimentar en el análisis por CG-EM una fragmentación con pérdida total de la cadena lateral. De esta manera, generaría un espectro semejante al del 2,6-dimetoxifenol, en el que está ausente el pico  $M^+$ , correspondiente al ión molecular.

#### B) Valoraciones semicuantitativas

La tabla X.1.12 reúne los resultados de las identificaciones

y valoraciones semicuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de maderas de *E. camaldulensis*. En el Apéndice II, se incluyen las tablas con los valores de las áreas de los picos cromatográficos (en unidades de integrador), que se han utilizado para la elaboración de las tablas de valoraciones semicuantitativas.

Tabla X.1.12: Valoración semicuantitativa por CLAR de los componentes de los extractos etéreos de madera de <i>E. camaldulensis</i>								
Pico	Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	Ac. gálico	t	+	t	t	t	t	t
2	*	+	+	+	+	+	t	t
3	*	++	+	++	+	+++	t	t
4	Ac. vainílico	-	-	-	-	-	t	t
5	Vainillina	t	+	+	+	+	+	+
6	Ald. siríngico	+	++	+++	+	+	+	++
7	Der. siríngico	+	++	+++	+	+	++	++
8	Flavanona	-	-	-	-	-	++	+
9	*	+	-	-	t	-	-	-
10	*	++	-	+	+	++	-	-
11	Ac. elágico	+	++++	+++	++	++	+++	+++
12	Flavanona	-	-	-	-	-	++	+
13	*	-	-	-	-	-	++	++
14	Elagitanino	+	+	+	-	+	+	++
15	Elagitanino	+	++	-	+	+	-	-
16	Naringenina	-	-	+	+	-	-	-
17	Elagitanino	+	+	+	t	+	+	+
18	Flavanona	-	-	+	-	-	-	-
19	Elagitanino	+	+	+	t	+	+	++
20	Flavanona	-	-	-	-	-	+	+

H = Huelva, P = Pontevedra; EC = *E. camaldulensis*; t = trazas; \* = no identificado.

De acuerdo con los resultados anteriores, podríamos clasificar las muestras en tres grupos:

1. Formado por HEC1, HEC4 y HEC5, caracterizadas por bajos contenidos de vainillina, aldehído siríngico, del derivado del ácido o aldehído siríngico (7) y ácido elágico.
2. Formado por HEC2 y HEC3, caracterizadas por altas concentraciones de vainillina, aldehído siríngico, del derivado del ácido o aldehído siríngico (7) y ácido elágico.

3. Constituido por PEC1 y PEC2, que presenta bajas concentraciones de 2 y 3, concentraciones medias de vainillina, aldehído siríngico y del derivado del ácido o aldehído siríngico (7), y altas de ácido elágico. Otra característica diferenciadora de éste grupo es el mayor contenido de flavanonas.

El grupo de elagitaninos no presenta una distribución que permita su utilización como elemento diferenciador en la clasificación de muestras.

Nota: las abundancias relativas que figuran en la tabla X.1.12 no son comparables con las correspondientes de corteza y hojas, debido a la distinta manipulación de las muestras. Para tener una idea exacta de la concentración real de cada componente, en los extractos de cada una de las partes del árbol, conviene acudir a las valoraciones cuantitativas.

#### 1.4.2. Corteza

##### A) Identificaciones.

La figura X.1.9 contiene los cromatogramas modelo de extractos etéreos de cortezas de *E. camaldulensis*. La numeración no es equivalente a la de los cromatogramas de madera.

Los componentes identificados de forma directa por CLAR son:

- Acido gálico (1)
- Acido protocatéquico (2)
- Aldehído protocatéquico (3a)
- Acido vainíllico (4)
- Acido siríngico (5)
- Vainillina (6)
- Naringina (8)
- Acido elágico (9)
- Quercitrina (10)

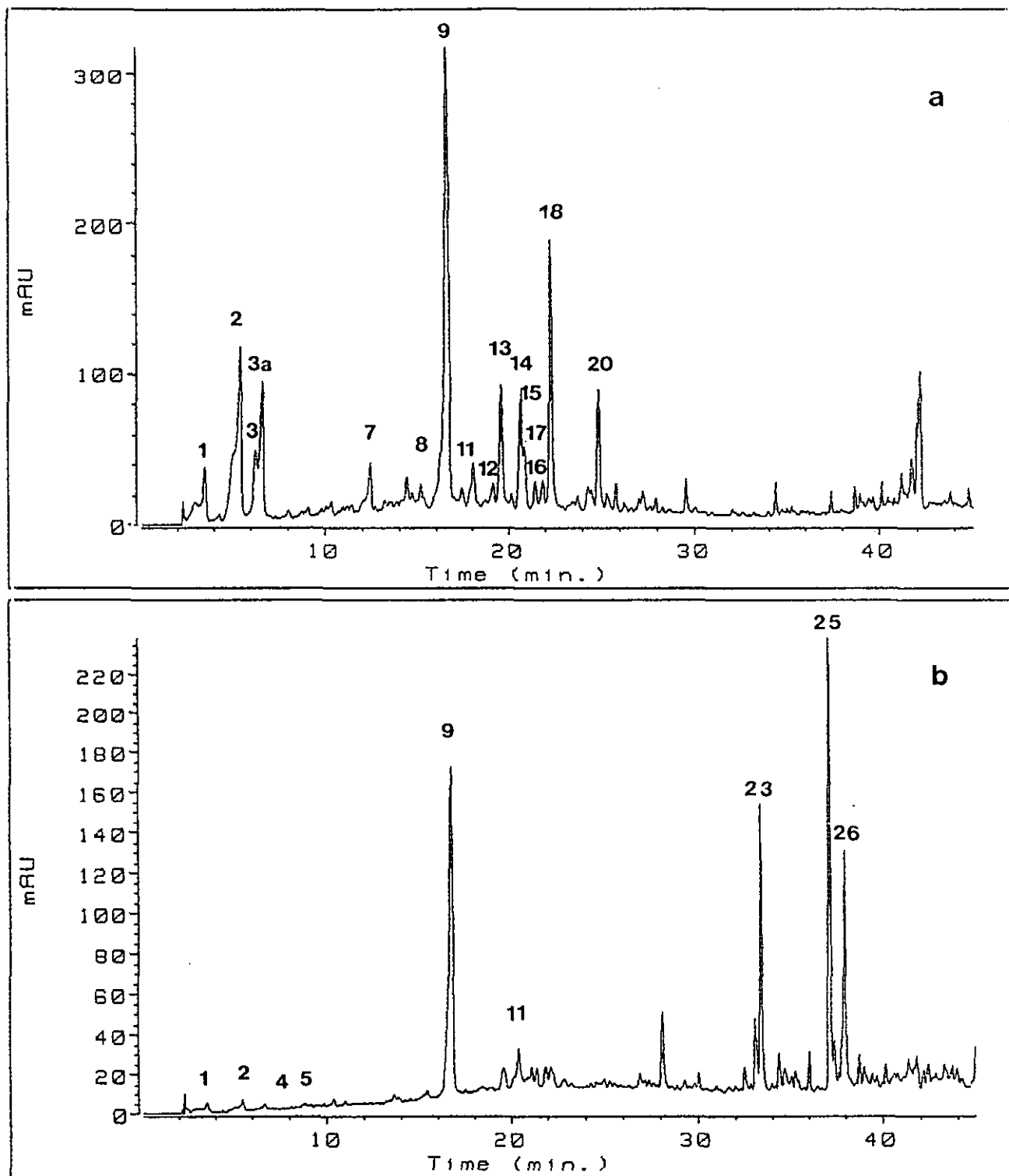


Figura X.1.9: Cromatogramas de extractos etéreos de corteza de *E. camaldulensis*. a: HEC2. b: PEC2. (Absorbancia a  $325 \pm 75$  nm).



- Eriodictyol (11)
- Quercetina (14)
- Naringenina (15)
- Luteolina (17)
- Kaempferol (19)

También se ha podido reconocer la presencia de elagitaninos, cuyo espectro UV es muy semejante al del ácido elágico, componente básico de su estructura.

Asimismo, se han detectado algunas flavanonas y un flavonol, aunque no ha sido posible identificarlos con precisión.

\* Identificación del pico 23

En el apartado X.3.4.2., se describe la identificación de este compuesto, junto a la de otros de estructura semejante, detectados en *E. rudis*.

B) Valoraciones semicuantitativas.

La tabla X.1.13 reúne los resultados de las identificaciones y valoraciones semicuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de corteza de *E. camaldulensis*. En el Apéndice II, se reúnen los valores de las áreas de los picos cromatográficos, en unidades de integrador.

Tabla X.1.13: Valoración semicuantitativa por CLAR de los componentes de los extractos etéreos de corteza de *E. camaldulensis*

Pico	Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	Ac. gálico	+	+	+	+	+	t	t
2	Ac. protocatéquico	++	++	-	++	-	t	t
3	*	+	+	++	-	++	-	-
3a	Ald. protocatéquico	+	+	+	+	+	-	-
4	Ac. vainíllico	-	-	-	-	-	t	-
5	Ac. siríngico	-	-	-	-	-	t	-
6	Vainillina	+	-	-	-	-	t	-
7	Flavanona	+	+	+	-	+	-	-
8	Naringina	-	+	-	-	-	-	-
9	Ac. elágico	+++	+++	++++	++	++++	++	++
10	Quercitrina	-	-	+	-	+	-	-
11	Eriodictyol	+	+	-	-	+	+	-
12	Elagitanino	+	+	+	-	+	-	-
13	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+
14	Quercetina	+	+	+	+	+	-	-
15	Naringenina	+	+	+	-	+	-	-
16	Flavanona	+	+	++	-	+	-	-
17	Luteolina	+	+	+	-	+	-	-
18	Flavonol	+	++	+	-	+	-	-
19	Kaempferol	-	-	-	-	+	-	-
20	Flavanona	+	+	+	-	-	-	-
21	Elagitanino	-	-	-	+	+	-	-
22	*	-	-	-	-	-	+	-
23	Est.met.ác.benzoico	-	-	-	-	-	-	t
24	*	-	-	-	-	-	+	-
25	*	-	-	-	-	-	-	+
26	*	-	-	-	-	-	-	+

H = Huelva, P = Pontevedra; EC = *E. camaldulensis*; t = trazas; \* = no identificado.

Se observan las siguientes diferencias entre las muestras estudiadas:

1. Los contenidos de ácidos y aldehídos fenólicos. Los contenidos de estos compuestos (ácidos gálico, elágico y protocatéquico; aldehídos protocatéquico y pico 3) diferencian las muestras de Huelva de las de Pontevedra, muy pobres en este grupo de componentes. Dentro de las muestras de Huelva, podemos establecer dos subgrupos. El primero, formado por HEC1, HEC2 y HEC4, con altos contenidos de ácido protocatéquico y baja concentración o ausencia del pico 3. El segundo, formado por HEC3 y HEC5, caracterizado por la

ausencia de ácido protocatéquico y alta concentración del pico 3. No consideramos relevantes la presencia de vainillina y de los ácido vainílico y ácido sirínico, porque estos últimos sólo se encuentran en una muestra de Pontevedra en trazas; y la vainillina sólo aparece en dos muestras, una de Huelva y otra de Pontevedra, en muy baja concentración.

2. Las muestras de Huelva son más ricas en flavanonas (naringina, eriodictyol, naringenina, y los compuestos 7, 16 y 20) y flavonoles (quercitrina, quercetina y compuesto 18) que las de Pontevedra.

3. Los componentes de los picos de 22-26, de baja polaridad, parecen característicos de las muestras de Pontevedra.

#### 1.4.3. Hojas

##### A) Identificaciones

La figura X.1.10 contiene los cromatogramas modelo de extractos etéreos de hojas de *E. camaldulensis*.

Se han identificado directamente por CLAR:

- Ácido gálico (1)
- Ácido protocatéquico (2)
- Vainillina (3)
- Ácido elágico (8)
- Luteolina (14)
- Kaempferol (17)

Se han reconocido, por su espectro UV, elagitaninos y flavonoles. De estos compuestos, se ha prestado especial atención a la identificación del grupo de flavonoles, puesto que son los componentes mayoritarios en los extractos de hojas.

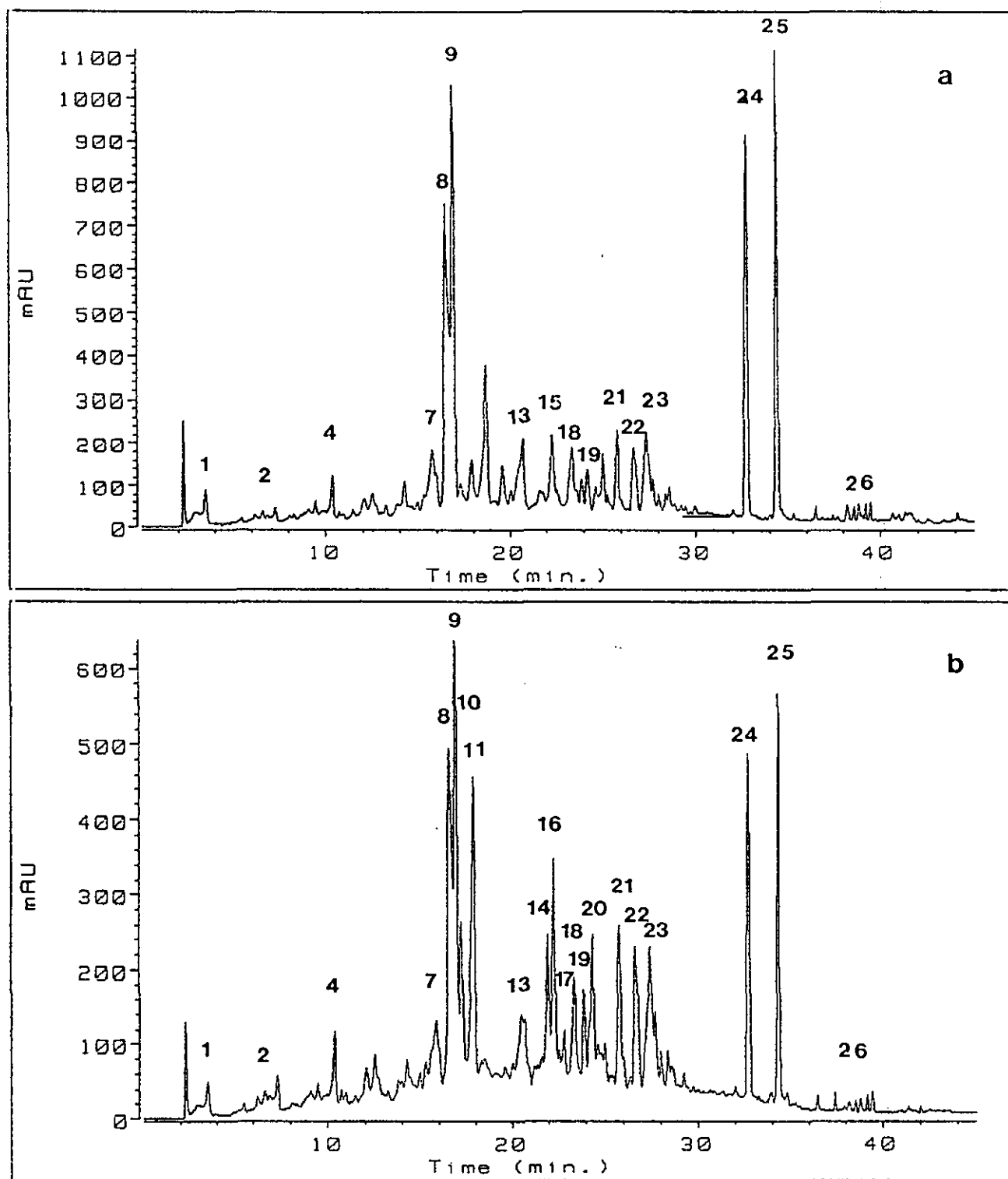


Figura X.1.10: Cromatogramas de extractos etéreos de hojas de *E. camaldulensis*. a: HEC1. b: HEC2. (Absorbancia a  $325 \pm 75$  nm).

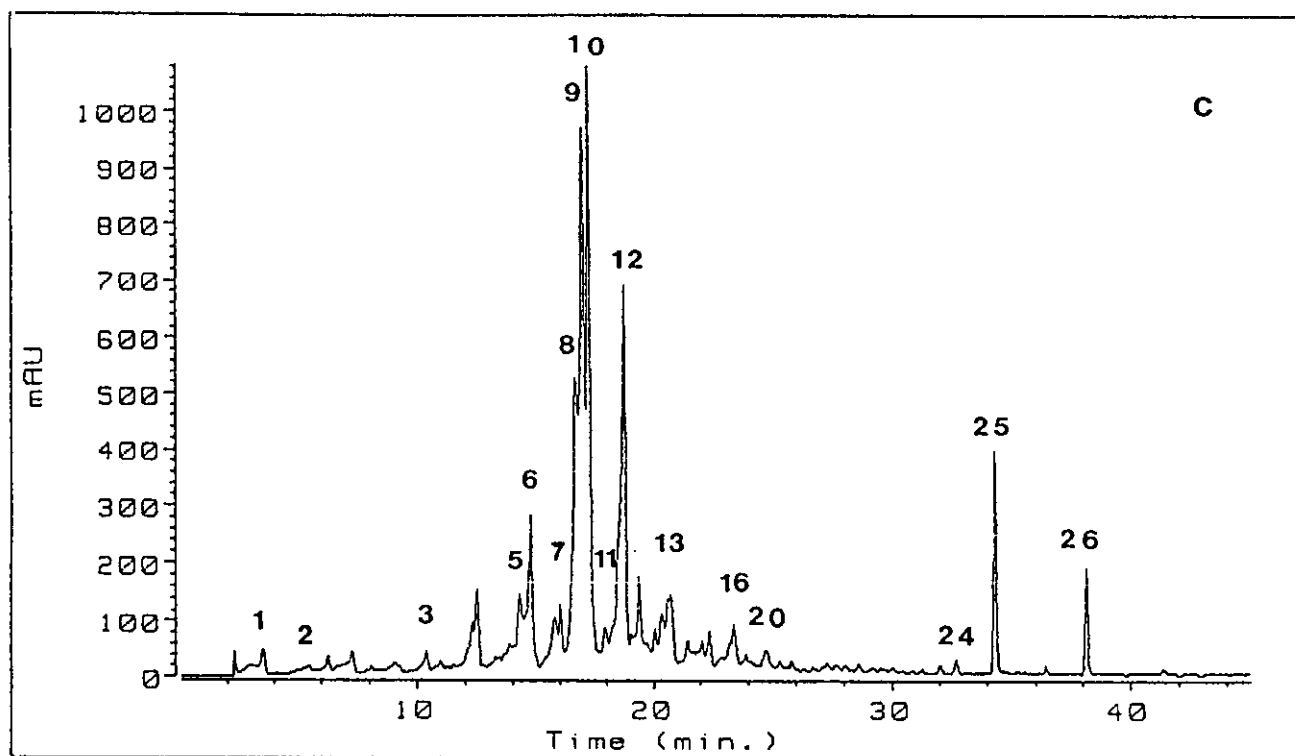


Figura X.1.10 (Cont.): Cromatogramas de extractos etéreos de hojas de *E. camaldulensis*. c: PEC2. (Absorbancia a 325±75 nm).

\* Identificación de los glicósidos de flavonol

Objeto de identificación han sido los picos 7, 9, 10, 11 y 12.

Se aplicaron los métodos de hidrólisis, descritos en el apartado VII.3.1., a los extractos completos, y a los glicósidos aislados por cromatografía semipreparativa.

Inicialmente se supuso que la hidrólisis de los extractos completos podría aportar suficiente información para la identificación de los glicósidos de flavonol. El reconocimiento de los aglicones se realizó sin problemas, a partir del hidrolizado del extracto completo. Sin embargo, el análisis de azúcares proporcionó unos resultados confusos, ya que no se pudo establecer una relación de proporcionalidad entre las abundancias relativas de los azúcares liberados y las de los glicósidos originales. Esto fue debido, en muchos casos, a que la hidrólisis

no había sido completa.

Se consideró conveniente aislar los glicósidos, por CLAR semipreparativa, a partir de muestras seleccionadas, en las cuales cada glicósido se encontrara en alta concentración y libre de sustancias interferentes. Así, se utilizaron:

- HER4, para el aislamiento de los picos 7, 9 y 12
- HEG2, para el pico 11
- PEC2, para los picos 9, 10 y 12

En el caso del pico 9, no se pudo evitar arrastrar, en el proceso de purificación, ácido elágico que no interfirió en las posteriores determinaciones.

El análisis de aglicones dio, como resultado, que los glicósidos 7, 9, 10 y 11 tienen, como componente flavónico, la quercetina, mientras que el 12 es un glicósido de kaempferol.

Los azúcares procedentes de la hidrólisis fueron sometidos a transformación en los TMS-derivados que se analizaron por CG-EM. Los resultados fueron los siguientes:

- A partir del glicósido 7, se obtuvo ramnosa y glucosa. Como los disacáridos se hidrolizan en las condiciones de análisis utilizadas, se puede pensar que la ramnosa y la glucosa proceden del disacárido rutinosa. Por ello, el pico 7 sería la rutina, lo que estaría de acuerdo con su posición cromatográfica.
- El azúcar, procedente de 9, es la arabinosa. De acuerdo con su espectro UV, cabe pensar que 9 es el quercetín-3-arabinósido.
- A partir de 10 y 11, se obtiene ramnosa. Como el aglicón es el mismo en ambos casos, el espectro UV fue determinante para la asignación estructural (MARKHAM, 1982). Se ha

atribuido a 10 la estructura de quercetín-3,7-diramnósido; y a 11, la de quercetín-3-ramnósido (quercitrina).

- De la hidrólisis de 12, se ha obtenido kaempferol, como aglicón; y arabinosa, como azúcar. La posición más probable de unión es por el 3-OH del aglicón.

\* Identificación de 24, 25 y 26.

El espectro UV de estos componentes presentaba dos máximos de absorción, a 275 nm y 330 nm (figura X.1.11).

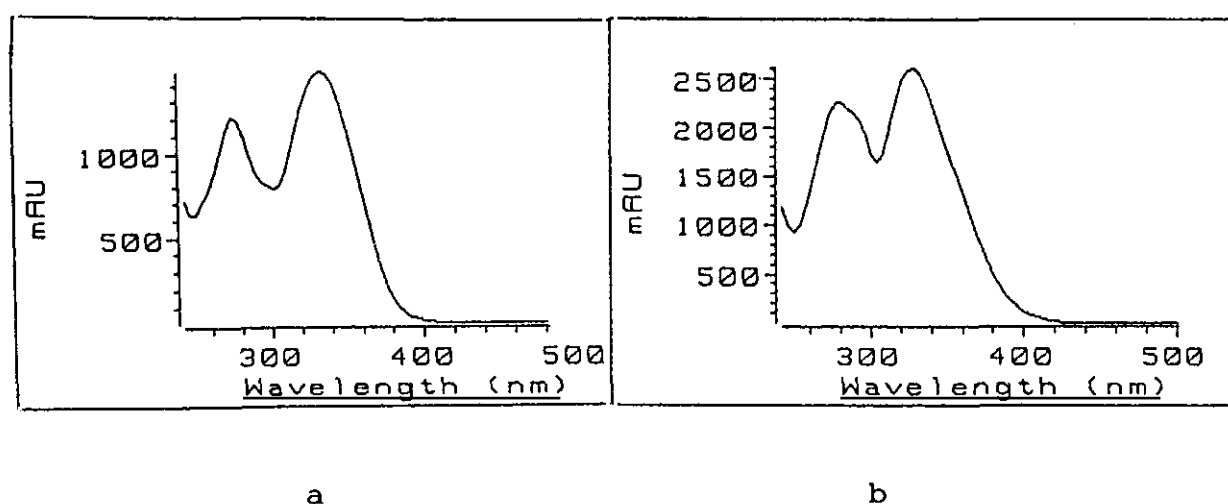


Figura X.1.11: Espectros UV de los componentes de los picos 24 (a) y 25 (b) de los extractos de hojas de *E. camaldulensis*.

Estos compuestos, aislados por CLAR semipreparativa, fueron estudiados por CG-EM. Los espectros de masas obtenidos presentan gran semejanza con los de un compuesto de estructura naftalénica y de un derivado del azuleno (figura X.1.12A y B). Ambos compuestos son equivalentes en el número de carbonos y en la insaturación, pero presentan distinto tipo de ciclación. Pensamos que podría tratarse de compuestos sesquiterpénicos.

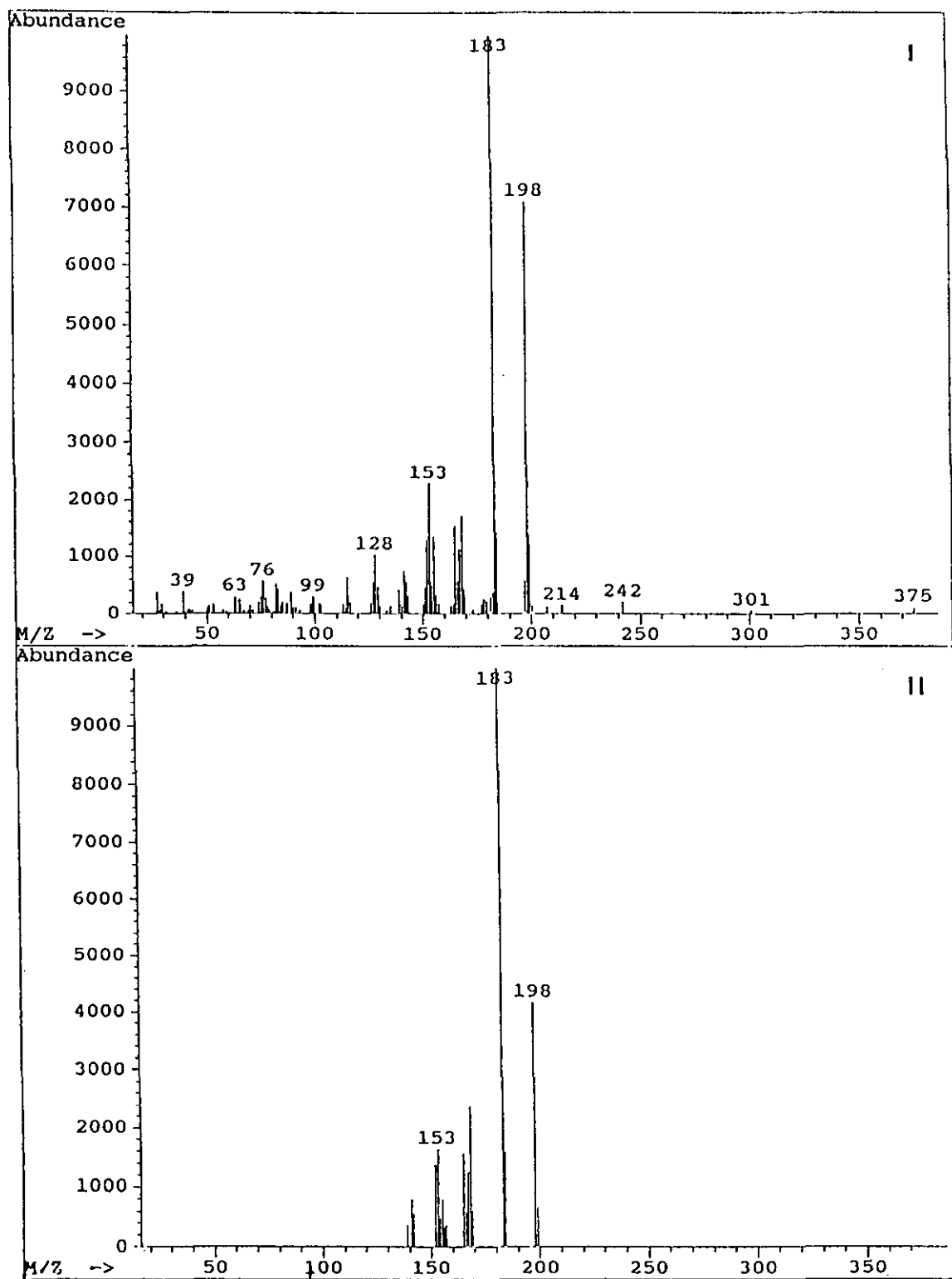


Figura X.1.12A: Espectro de masas de los componentes 24, 25 y 26 (I) y el de un derivado del naftaleno (II).



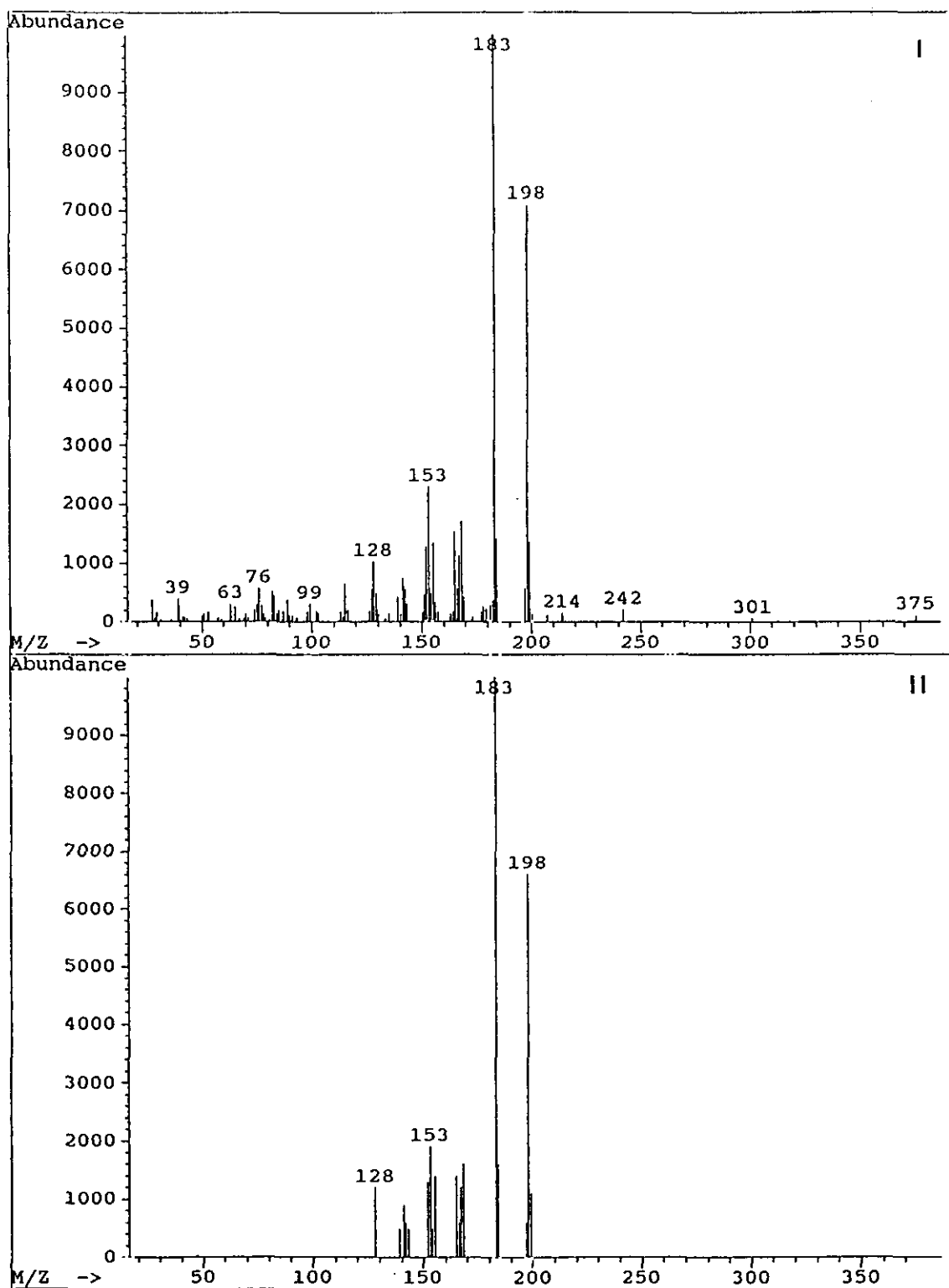


Figura X.1.12B: Espectro de masas de los componentes 24, 25 y 26 (I) y el de un derivado del azuleno (II).

## B) Valoraciones semicuantitativas

La tabla X.1.14 contiene los resultados de las valoraciones semicuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de hojas de *E. camaldulensis*. En el Apéndice II, se reúnen los valores de áreas de los picos cromatográficos, en unidades de integrador.

Tabla X.1.14: Valoración semicuantitativa por CLAR de los componentes de los extractos etéreos de hojas de <i>E. camaldulensis</i>								
Pico	Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	Ac. gálico	+	+	+	+	+	+	+
2	Ac. protocatéquico	+	+	+	+	+	+	+
3	Vainillina	-	-	-	-	-	+	+
4	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	-
5	Flavonol	-	-	-	-	-	+	+
6	Flavonol	-	-	-	-	-	++	++
7	Rutina	++	+	+	++	+	+	+
8	Ac. elágico	++++	+++	++++	+++	+++	+++	+++
9	Quercetín-3-arabinósido	++++	++	++++	+++	-	+++++	++++
10	Quercetín-3,7-diramnósido	-	+	+	-	-	+++++	++++
11	Quercitrina	-	++	+	+	-	+	+
12	Kaempferol-3-arabinósido	-	-	-	++	++	++++	++++
13	*	++	+	+	+	++	+	+
14	Luteolina	-	++	-	-	-	-	-
15	*	++	-	-	+	+	-	-
16	Flavonol	-	++	++	-	-	+	+
17	Kaempferol	-	+	-	-	-	-	-
18	*	+	++	+	+	+	-	-
19	*	+	+	+	+	-	-	-
20	Flavonol	-	++	+	-	-	+	+
21	*	+	++	+	++	+	-	-
22	*	+	+	+	++	+	-	-
23	*	++	++	+	++	+	-	-
24	Sesquiterpeno (?)	+++	++	+++	++	+++	+	+
25	Sesquiterpeno (?)	+++	++	+++	+++	++++	++	+
26	Sesquiterpeno (?)	+	t	+	+	+	+	+

H = Huelva, P = Pontevedra; EC = *E. camaldulensis*; t = trazas; \* = no identificado.

Los extractos de hojas de *E. camaldulensis* parecen agruparse en dos bloques principales. El primero de ellas está constituido

por las muestras de Huelva y el segundo, por las de Pontevedra. Este segundo bloque presenta un mayor contenido y variedad de flavonoles, tanto glicósidos como aglicones.

Dentro de las muestras de Huelva, HEC1, HEC4 y HEC5 presentan un patrón de composición química más simple, con ausencia de quercetín-3,7-diramnósido y de los flavonoles 16, 20 y kaempferol.

#### 1.4.4. Conclusiones

Al comparar la composición de los extractos de madera, corteza y hojas de *E. camaldulensis*, se observa que:

1. La variedad y riqueza en ácidos y aldehídos fenólicos es mayor en las maderas y cortezas que en las hojas, donde sólo se han detectado vainillina y los ácidos gálico, protocatéquico y elágico.
2. Respecto a los otros grupos de polifenoles, la complejidad de las muestras aumenta al pasar de maderas a cortezas y de éstas a hojas. Las maderas se caracterizan por su contenido de flavanonas y elagitaninos. Las cortezas contienen, además, flavonoles (quercitrina, quercetina y kaempferol) y flavonas (luteolina). En las hojas, el contenido de elagitaninos disminuye, pero los extractos se enriquecen con una amplia variedad de flavonoles.
3. De acuerdo con la composición de los extractos de madera y hojas, las muestras se clasifican en tres grupos. Por un lado, HEC1, HEC4 y HEC5, por otro, HEC2 y HEC3, y, en tercer lugar, PEC1 y PEC2. Sin embargo, las cortezas proporcionan una clasificación parcialmente diferente. Las muestras de Huelva y las de Pontevedra siguen separadas, pero las de Huelva se agrupan en HEC1, HEC2 y HEC4, por un lado, y HEC3 y HEC5 por otro.

## 1.5. VALORACIONES CUANTITATIVAS

En este apartado, se reúnen los resultados de la cuantificación de algunos de los componentes químicos de los extractos de madera, corteza y hojas de *E. camaldulensis*, realizadas por el método del patrón externo. Para la elaboración de las rectas de calibración, se han empleado patrones comerciales de los componentes correspondientes.

Tabla X.1.15: Valoraciones cuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de madera de <i>E. camaldulensis</i>							
Compuesto	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
Acido gálico							
μg/ml	t	t	t	t	t	t	t
μg/g mat. seca	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc
Vainillina							
μg/ml	t	12,0	31,2	t	5,6	t	24,6
μg/g mat. seca	Nc	3,4	8,8	Nc	1,6	Nc	7,0
Acido elágico							
μg/ml	28,8	174,7	88,4	40,9	34,6	89,1	90,1
μg/g mat. seca	8,3	50,1	24,9	11,5	9,8	25,3	25,8
Naringenina							
μg/ml	0	0	66,7	t	0	0	0
μg/g mat. seca	0	0	18,8	Nc	0	0	0

t = trazas, Nc = No cuantificable.

Tabla X.1.16: Valoraciones cuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de corteza de *E. camaldulensis*

Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
Acido gálico							
μg/ml	29,9	64,9	51,4	t	45,8	t	t
μg/g mat. seca	17,7	38,2	37,7	Nc	26,6	Nc	Nc
Ac. protocatéquico							
μg/ml	260,8	216,2	0	200,0	0	t	t
μg/g mat. seca	154,5	127,4	0	117,2	0	Nc	Nc
Ald. protocatéquico							
μg/ml	75,3	81,3	32,9	106,6	27,5	0	0
μg/g mat. seca	44,6	47,9	24,1	62,5	15,9	0	0
Vainillina							
μg/ml	8,5	0	0	0	0	0,2	0
μg/g mat. seca	5,0	0	0	0	0	0,1	0
Acido elágico							
μg/ml	178,3	203,4	299,1	163,6	336,5	92,9	97,0
μg/g mat. seca	105,7	119,9	219,1	95,9	195,1	55,3	57,5
Quercitrina							
μg/ml	0	0	41,6	0	23,8	0	0
μg/g mat. seca	0	0	30,5	0	13,8	0	0
Eriodictyol							
μg/ml	80,9	105,7	0	0	100,1	74,1	0
μg/g mat. seca	47,9	62,3	0	0	58,0	44,1	0
Quercetina							
μg/ml	t	t	t	t	t	0	0
μg/g mat. seca	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	0	0
Naringenina							
μg/ml	47,8	33,9	8,3	0	108,6	0	0
μg/g mat. seca	28,3	20,0	6,1	0	63,0	0	0
Luteolina							
μg/ml	t	t	t	0	21,4	0	0
μg/g mat. seca	Nc	Nc	Nc	0	12,4	0	0
Kaempferol							
μg/ml	0	0	0	0	t	0	0
μg/g mat. seca	0	0	0	0	Nc	0	0

t = trazas, Nc = No cuantificable.

Tabla X.1.17: Valoraciones cuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de hojas de *E. camaldulensis*

Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
Acido gálico							
µg/ml	214,1	101,5	190,0	148,3	152,9	270,4	101,4
µg/g mat. seca	62,0	29,1	54,5	43,0	44,3	77,5	29,4
Acido protocatéquico							
µg/ml	44,4	36,2	64,2	36,2	42,4	77,7	43,7
µg/g mat. seca	12,9	10,4	18,4	10,5	12,3	22,3	12,7
Vainillina							
µg/ml	0	0	0	0	0	37,5	30,2
µg/g mat. seca	0	0	0	0	0	10,7	8,7
Acido elágico							
µg/ml	447,9	287,8	326,4	286,8	299,4	362,7	271,1
µg/g mat. seca	129,8	82,5	93,6	83,1	86,8	104,0	78,6
Quercitrina							
µg/ml	0	385,5	122,6	186,6	0	58,0	48,2
µg/g mat. seca	0	110,5	35,1	54,1	0	16,6	14,0
Luteolina							
µg/ml	0	190,2	0	0	0	0	0
µg/g mat. seca	0	54,5	0	0	0	0	0
Kaempferol							
µg/ml	0	22,0	0	0	0	0	0
µg/g mat. seca	0	6,3	0	0	0	0	0

t = trazas, Nc = No cuantificable.

## 2. EUCALYPTUS GLOBULUS LABILL.

### 2.1. CARATERIZACION DE MUESTRAS

#### 2.1.1. Caracterización de hojas. Análisis de aceites esenciales

Los resultados del análisis de la composición de los aceites esenciales de las hojas de *E. globulus*, se resumen en la tabla X.2.1, que incluye también los rendimientos de destilación. La concentración de cada componente se expresa en porcentaje de las áreas de los picos cromatográficos correspondientes. La figura X.2.1 incluye cromatogramas modelo de las muestras de aceites esenciales de *E. globulus*.

Tabla X.2.1: Composición de los aceites esenciales de hojas de <i>Eucalyptus globulus</i>											
Pico	Componente	Concentración (%)									
		HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	$\alpha$ -Pineno	12,1	9,4	10,0	8,8	7,0	3,4	12,0	5,9	0,9	5,1
2	Limoneno	4,9	1,1	1,0	2,8	2,1	4,9	3,2	2,9	1,2	4,2
3	1,8-Cineol	66,7	68,5	69,7	76,1	76,4	57,2	64,0	73,8	51,6	65,6
4	<i>p</i> -Cimeno	0,9	0,4	0,9	0,7	0,4	1,8	1,6	1,2	2,4	2,1
5	Pinocarvona	0,2	2,7	1,0	1,4	1,9	0,3	1,4	1,5	5,2	0,6
6	Mirtenal	0,3	0,5	0,4	0,8	0,7	2,5	0,3	0,7	0,9	1,2
7	Aromadendreno	0,4	0,2	0,4	0,3	0,1	0,7	0,3	0,3	0,2	0,5
8	Alloaromaden.	0,2	0,1	0,1	t	t	t	t	0,1	0,2	0,1
9	<i>t</i> -Pinocarveol	0,4	4,2	1,8	2,3	2,7	0,3	1,8	3,5	8,4	1,5
10	Ac. $\alpha$ -terpinilo	4,5	1,0	3,3	t	0,0	7,6	4,7	t	2,4	0,1
11	$\alpha$ -Terpineol	1,1	0,9	2,0	0,8	1,1	1,9	0,9	1,7	1,2	2,8
12	Mirtenol	0,1	0,5	0,4	0,4	0,5	0,1	0,4	0,6	1,7	0,3
13	Globulol	0,8	1,3	1,3	1,9	2,4	7,5	1,6	3,0	8,4	6,1
Rendimiento (%)		4,13	1,68	2,28	1,85	2,53	1,32	1,06	1,07	1,06	1,22

H = Huelva, P = Pontevedra, EG = *E. globulus*.

t = trazas (<0,1 %); 0,0 = no detectado.

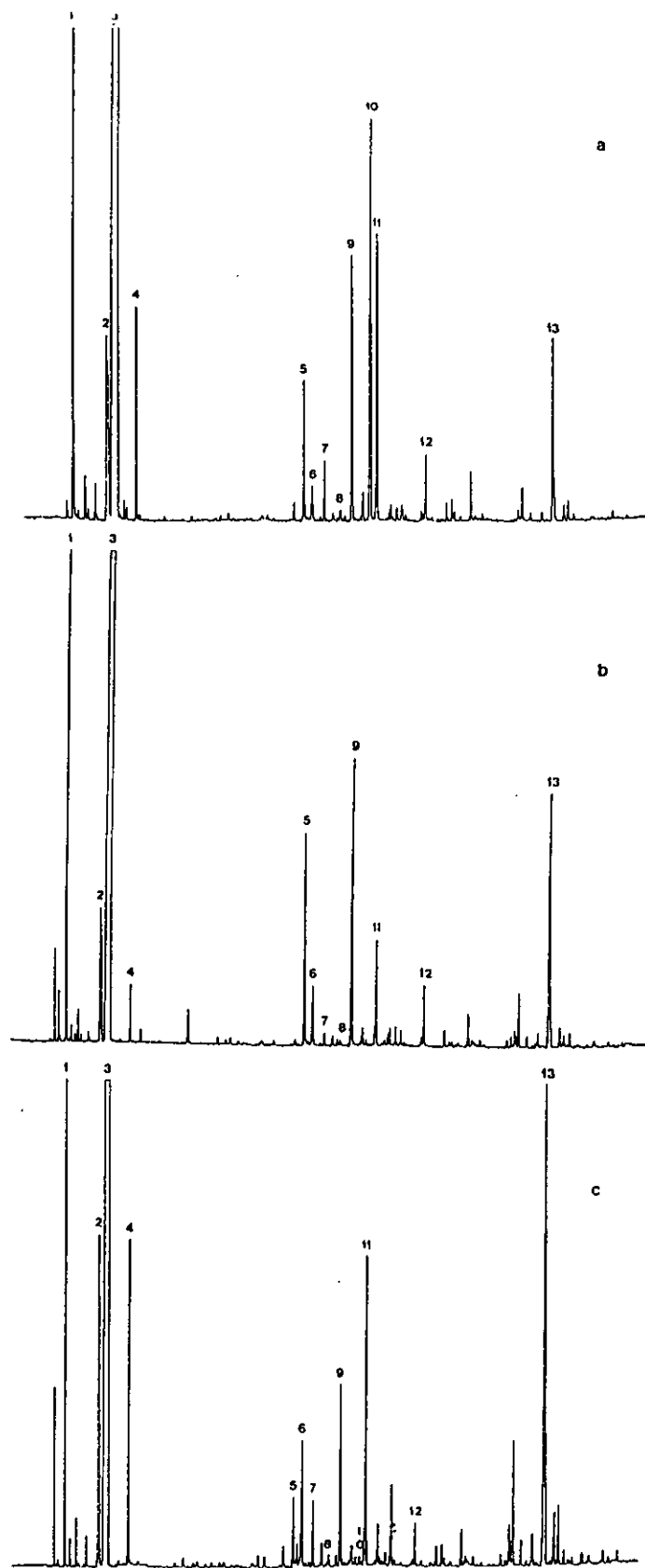


Figura X.2.1: Cromatogramas de aceites esenciales de *E. globulus*.  
a: HEG3. b: HEG5. c: PEG5.



*E. globulus* es la especie más utilizada para la obtención del aceite esencial oficial de eucalipto, caracterizado por sus altos contenidos de 1,8-cineol, en concentraciones superiores al 60 %, y  $\alpha$ -pineno. En los aceites esenciales españoles se han identificado, además de los componentes mayoritarios citados, otros 38 componentes, generalmente en concentraciones inferiores al 5 %. De estos, los más abundantes son: limoneno, mirceno, *p*-cimeno, pinocarvona, *trans*-pinocarveol, mirtenol, acetato de  $\alpha$ -terpinilo,  $\alpha$ -terpineol, aromadendreno y globulol (GARCIA MARTIN y GARCIA VALLEJO, 1977; RENEDO OMAECHEVARRIA *et al.*, 1992).

Los rendimientos de destilación obtenidos por nosotros presentan valores más uniformes en las muestras de Pontevedra, siendo más bajos que los de las muestras de Huelva. Entre ellas, la muestra HEG1 presenta el valor máximo. No son comparables a los de la bibliografía.

El componente mayoritario en todas las muestras es el 1,8-cineol (eucalyptol), terpenoide típico del género *Eucalyptus*, con porcentajes que oscilan entre el 66,7-76,4 % para las de Huelva y el 51,6-73,8 % para las de Pontevedra.

El  $\alpha$ -pineno se encuentra también en elevada concentración en todos los aceites esenciales, a excepción de la muestra PEG4. Esta muestra se caracteriza también por su mayor contenido en pinocarvona, *trans*-pinocarveol y globulol.

Las muestras de ambas procedencias fueron poco variables químicamente. Sin embargo, pueden clasificarse en tres grupos atendiendo a la concentración de acetato de  $\alpha$ -terpinilo y de pinocarvona y *trans*-pinocarveol. Los grupos resultantes, en orden decreciente del contenido de acetato de  $\alpha$ -terpinilo y creciente de pinocarvona y *trans*-pinocarveol, están representados por: HEG1, PEG1 y PEG2; HEG2, HEG3 y PEG4; y HEG4, HEG5, PEG3 y PEG5.

## 2.1.2. Caracterización de maderas. Determinaciones químicas. Normas.

A continuación, en la tabla X.2.2, se exponen los resultados de los análisis normalizados de las muestras de madera de *E. globulus*, para la determinación de humedad, cenizas, solubilidades en agua caliente y fría, en sosa, extractos en alcohol-benceno, contenidos en ligninas, holocelulosa y pentosanos, que se llevan a cabo como paso previo a la obtención de pasta de papel.

Tabla X.2.2: Análisis químico de maderas de <i>E. globulus</i>										
Muestra	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
Extr. alc.- benceno	2,03	1,71	2,01	2,19	1,93	1,71	1,43	1,31	1,45	1,32
Cenizas	1,06	0,87	1,21	0,44	1,14	2,06	1,21	0,73	0,66	0,85
Solub. agua fría	3,00	4,27	3,88	4,37	3,66	4,02	3,89	2,98	4,45	2,19
Solub. agua cal.	3,27	4,29	5,60	4,05	4,51	5,61	4,43	3,48	4,46	3,04
Solub. sosa	13,67	15,30	16,26	13,80	19,40	18,90	19,50	15,60	17,50	15,03
Holocel.	84,79	85,39	84,76	84,42	82,50	82,97	82,62	84,64	82,66	85,05
Ligninas	19,38	20,87	22,56	22,62	20,24	20,99	22,76	22,52	20,75	24,68
Pentosanos	22,25	24,84	25,79	23,78	21,81	23,62	24,25	19,96	22,95	22,42

H = Huelva, P = Pontevedra, EG = *E. globulus*.

Los datos bibliográficos sobre análisis químicos de maderas de *E. globulus* (ALONSO AGUILAR, 1976; BUSTAMANTE EZPELETA y SANTOS VIQUEIRA, 1983) muestran unos rangos de variación más pequeños que nuestros resultados. Esto es especialmente notable en el caso de las solubilidades en agua fría y caliente y en sosa; y en los contenidos en holocelulosa, para los cuales no hay solapamiento de los márgenes de variación de nuestras muestras con los bibliográficos.

Del estudio de los resultados de la tabla X.2.2, se puede concluir:

1. Extractos en alcohol-benceno. Todas las maderas de *E. globulus* dieron valores bajos de extractos en alcohol-benceno, siendo los de las muestras de Pontevedra inferiores a los de las de Huelva. Por ello, respecto a esta variable, se puede concluir que, aún presentando todas las muestras buenas propiedades, desde el punto de vista papelero, las de Pontevedra son ligeramente mejores que las de Huelva.

2. Cenizas. No se aprecia una clara diferencia en la carga inorgánica de las muestras de una y otra procedencia. No podemos considerar esta variable como indicador de calidad.

3. Solubilidades en agua fría y agua caliente. Valores elevados de solubilidades en agua fría y caliente representan pérdidas en los rendimientos de pasta. Las maderas de *E. globulus* estudiadas presentaron un reducido intervalo de variación de las solubilidades. Estos valores fueron intermedios entre los obtenidos para las maderas de *E. camaldulensis* de Huelva y de Pontevedra.

4. Solubilidad en sosa. Al igual que ocurría con las variables anteriores, las maderas de *E. globulus* presentaron valores de solubilidad, en sosa, intermedios entre los dos obtenidos con las muestras de *E. camaldulensis*, procedentes de Huelva y Pontevedra. Como ya se ha comentado, las soluciones de sosa caliente arrastran hemicelulosas y celulosas degradadas, y, por ello, el pequeño rango de variación dentro de las muestras de *E. globulus* determina que no existan unas grandes diferencias de calidad en lo referente a esta variable.

5. Holocelulosa y pentosanós. Tampoco existe una amplia variabilidad en los resultados, obtenidos en estos dos análisis, con las maderas de *E. globulus*. Como ya hemos

comentado, la mayor calidad de la madera está relacionada con contenidos altos en holocelulosa, y bajos en pentosanos. *E. globulus* dio mayores valores de holocelulosas y, también, mayores contenidos de pentosanos que *E. camaldulensis*, lo cual dificulta la comparación de la calidad relativa de ambos tipos de maderas.

6. Ligninas. Las muestras de *E. globulus* presentan también un reducido rango de variación en sus contenidos de ligninas, inferiores a los obtenidos con *E. camaldulensis*. Esto, unido a los valores superiores de holocelulosa, parece indicar una mayor calidad de las maderas de *E. globulus*, respecto a las de *E. camaldulensis*.

### 2.1.3. Conclusiones

1. De acuerdo con los análisis de los aceites esenciales de las hojas, las muestras de *E. globulus* no manifiestan grandes diferencias, puesto que el  $\alpha$ -pineno y el 1,8-cineol son los dos componentes mayoritarios en todas ellas (a excepción de PEG4, con bajo contenido en  $\alpha$ -pineno). Atendiendo a los contenidos de acetato de  $\alpha$ -terpinilo y *trans*-pinocarveol y de pinocarvona, es posible establecer una clasificación, que consideramos de poca relevancia.

2. El análisis químico de las maderas no revela diferencias significativas entre las muestras de *E. globulus*. La comparación con *E. camaldulensis* establece que *E. globulus* presenta mejores cualidades para la producción de pasta de papel.

### 2.2. EXTRACCION. VALORACION DEL CONTENIDO EN FENOLES TOTALES DE LOS EXTRACTOS

Las tablas X.2.3, X.2.4 y X.2.5 contienen los rendimientos de las extracciones con MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20) y los de los posteriores fraccionamientos, con éter etílico, de las muestras de madera,

corteza y hojas de *E. globulus*; más los contenidos de fenoles totales de los correspondientes extractos.

### 2.2.1. Madera

Tabla X.2.3: Rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales de las muestras de madera de <i>E. globulus</i>			
Muestra	Extracto en MeOH-H <sub>2</sub> O (%)	Extracto en éter etílico (%)	Fenoles totales mg(c.q.)/g (*)
HEG1	3,61	0,22	8,27
HEG2	3,43	0,21	9,40
HEG3	2,71	0,23	8,94
HEG4	3,83	0,29	17,89
HEG5	3,84	0,27	19,16
PEG1	5,65	0,43	16,54
PEG2	2,79	0,33	7,84
PEG3	3,92	0,35	8,66
PEG4	3,76	0,35	10,74
PEG5	3,17	0,32	7,10

H = Huelva, P = Pontevedra, EG = *E. globulus*; (\*) c.q. = calculado en quercetina.

Los rendimientos globales de extracción presentan valores muy semejantes en las muestras de Huelva y de Pontevedra, con la excepción de la muestra PEG1, que dio el máximo rendimiento.

Hay que destacar los mayores rendimientos de extracto etéreo de las muestras de Pontevedra, y la ausencia total de proporcionalidad entre los rendimientos de los dos extractos y el contenido de fenoles totales, en las muestras estudiadas.

### 2.2.2. Corteza

En cuanto a los rendimientos globales, lo más destacable es la gran variación entre muestras de ambas procedencias (con valores que oscilan entre 2 y 12 %). Considerando valores medios, el rendimiento de los extractos metanólicos de las muestras de Huelva es mayor que el de las de Pontevedra.

Tabla X.2.4: Rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales de las muestras de corteza de *E. globulus*

Muestra	Extracto en MeOH-H <sub>2</sub> O (%)	Extracto en éter etílico (%)	Fenoles totales mg(c.q.)/g (*)
HEG1	12,27	1,16	33,22
HEG2	7,78	0,83	32,43
HEG3	4,47	1,34	11,25
HEG4	8,23	1,10	18,70
HEG5	6,08	1,32	15,61
PEG1	9,91	0,68	36,00
PEG2	2,80	0,83	8,41
PEG3	4,13	1,17	9,45
PEG4	3,89	1,08	9,08
PEG5	2,80	1,16	6,43

H = Huelva, P = Pontevedra, EG = *E. globulus*; (\*) c.q. = calculado en quercetina.

Sin embargo, no hay una marcada diferencia en los rendimientos etéreos. Los rangos de variación de los de una y otra procedencia se solapan (0,82-1,33 %, para Huelva; y 0,68-1,16 %, para Pontevedra).

El contenido en fenoles totales de las muestras de Pontevedra es menor que el de las de Huelva, con la excepción de PEG1 que presenta el valor máximo, de todas las muestras de corteza analizadas.

### 2.2.3. Hojas

Las hojas de *E. globulus*, al igual que las de *E. camaldulensis*, presentan rendimientos de extracción metanólica más altos que la madera y corteza.

No parece existir una relación de proporcionalidad entre rendimiento de extracto global, rendimiento de extracto etéreo y contenido en fenoles. La muestra que proporciona mayor rendimiento global de extracción (PEG4), no coincide con la que presenta mayor rendimiento de extracto etéreo (HEG5), y ninguna de ellas coincide con la de mayor contenido en fenoles (HEG4).

Tabla X.2.5: Rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales de las muestras de hojas de *E. globulus*

Muestra	Extracto en MeOH-H <sub>2</sub> O (%)	Extracto en éter etílico (%)	Fenoles totales mg(c.q.)/g (*)
HEG1	23,52	0,86	55,03
HEG2	26,36	0,75	50,55
HEG3	27,70	0,73	62,51
HEG4	26,02	0,77	72,69
HEG5	24,72	1,21	49,89
PEG1	21,59	0,68	44,00
PEG2	19,48	0,82	30,45
PEG3	24,94	0,63	53,76
PEG4	35,40	0,67	69,02
PEG5	22,10	0,66	53,04

H = Huelva, P = Pontevedra, EG = *E. globulus*; (\*) c.q. = calculado en quercetina.

### 2.2.3. Conclusiones

1. De forma semejante a lo que ocurría con *E. camaldulensis*, las hojas presentan valores más altos de rendimientos globales de extracción y de contenido en fenoles totales, aunque, son las cortezas las que muestran mayores rendimientos etéreos.

2. Dentro de cada grupo de muestras (madera, corteza y hojas), no existe la notable dispersión de valores que se observaba en *E. camaldulensis*. Por otro lado, tampoco se aprecia una marcada diferencia entre las muestras de Huelva y las de Pontevedra.

3. Tampoco se puede concluir, en este caso, que exista proporcionalidad entre las tres variables estudiadas.

### 2.3. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

A continuación, se exponen los resultados del análisis de las fracciones solubles en éter (extractos etéreos) de los extractos en metanol-agua de madera, corteza y hojas de *E.*

*globulus*, por CCF bidimensional sobre placas de celulosa, desarrolladas con la fase superior de n-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:5) (BAW), para la primera dimensión; y AcOH al 30 %, para la segunda; reveladas con el reactivo A de Neu y polietilenglicol.

Se tienen en cuenta las mismas consideraciones que se expusieron en el desarrollo de este apartado para *E. camaldulensis*.

### 2.3.1. Madera

La figura X.2.2 contiene las cromatoplasmas modelo de los extractos etéreos de madera de *E. globulus*.

La tabla X.2.6 recopila los valores R<sub>f</sub> y las coloraciones bajo luz UV y tras revelado con el reactivo A de Neu, de las distintas manchas, así como su posible identificación.

Tabla X.2.6: Componentes detectados en las placas de CCF, de los extractos etéreos de madera de <i>E. globulus</i>					
Mancha Nº	Rf		Color UV	Revelado React.A+PEG	Posible identificación
	1ª Dim.	2ª Dim.			
1	0,46	0,17	Am-Az	Az	Ac. elágico
2	0,82	0,51	Az	Az	Elagitanino
3	0,84	0,69	Az	Az	Elagitanino
4	0,86	0,87	Am	Am	Ac. o Ald. fenólico
5	0,90	0,97	Ma-Mo	Ma-Mo	Ac. o Ald. fenólico
6	0,74	0,78	Ma-Mo	Ma-Mo	Ac. o Ald. fenólico
9	0,90	0,01	Ma	Ma	*
10	0,79	0,08	-	Am	Flavonol
11	0,87	0,28	-	Am	Quercetina
12	0,56	0,52	Az	Az	Elagitanino
13	0,63	0,64	Az	Az	Elagitanino
14	0,66	0,73	Ma-Mo	Ma-Mo	Elagitanino

Am = amarillo, Az = azul, Ma = marrón, Mo = morado; \* = no identificado.

Por comodidad, se mantiene la misma numeración para las manchas, en las cromatoplasmas de madera de *E. globulus* y *E. camaldulensis*. A ello se debe que no figuren, en las tablas ni en los cromatogramas de *E. globulus*, las manchas 7 y 8, que aparecían con muy pequeña intensidad, en *E. camaldulensis*.



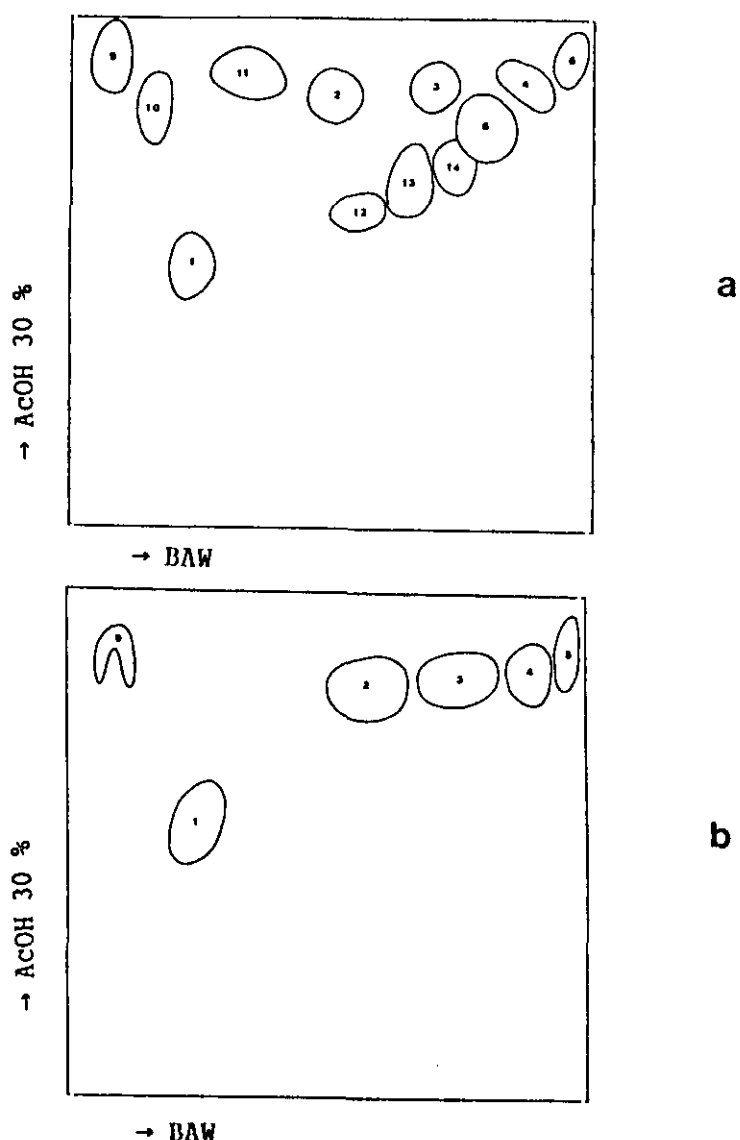


Figura X.2.2: Cromatoplasmas de extractos etéreos de madera de *E. globulus*. a: HEG3. b: PEG2.

Como ocurría con *E. camaldulensis*, la CCF ha permitido identificar compuestos, como la quercetina y el ácido elágico. En otros casos, se ha determinado la estructura de los compuestos de acuerdo con la coloración y la posición de sus manchas (ácido y aldehído fenólico, flavonoles o flavanonas).

La tabla X.2.7 recoge la distribución de componentes (manchas cromatográficas) de las muestras de madera de *E. globulus*.

Tabla X.2.7: Distribución de los componentes detectados por CCF en los extractos etéreos de madera de *E. globulus*

Nº	Componente	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	Ac. elágico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Ac. Ald. fenól.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Ac. Ald. fenól.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Ac. Ald. fenól.	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Flavonol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
11	Quercetina	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
13	Elagitanino	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
14	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

H = Huelva, P = Pontevedra, EG = *E. globulus*.

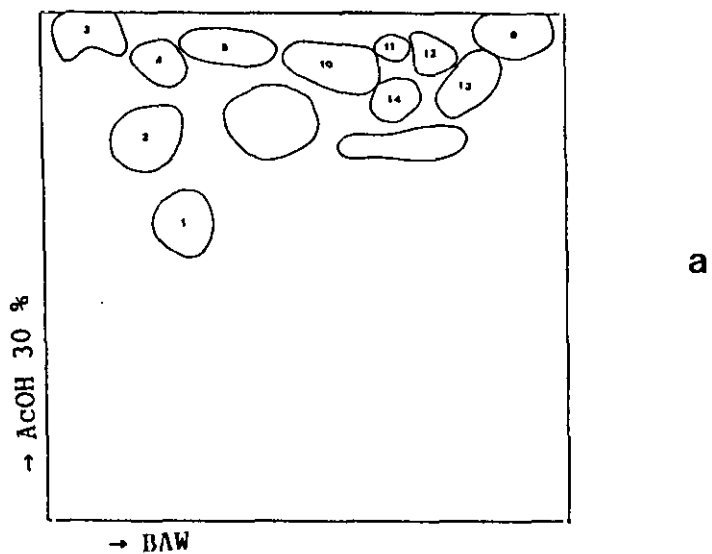
+ = presencia, - = ausencia; \* = no identificado.

Los extractos de madera de *E. globulus* parecen caracterizarse por una mayor variedad y cantidad de elagitaninos que los de *E. camaldulensis*. Se puede resaltar, asimismo, los flavonoles detectados que, aunque en escaso número y concentración, determinaron una mayor riqueza de las cromatoplasmas de *E. globulus*.

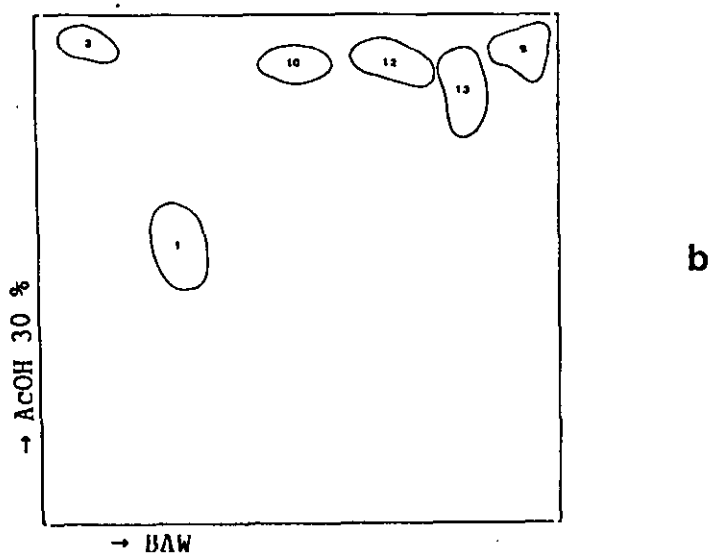
### 2.3.2. Corteza

La figura X.2.3 contiene las cromatoplasmas modelo de los extractos etéreos de corteza de *E. globulus*.

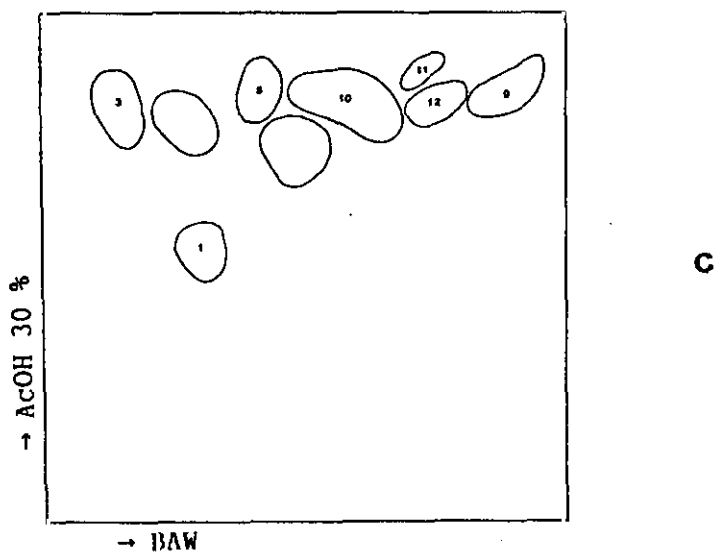
La tabla X.2.8 reúne los valores de  $R_f$  y las coloraciones bajo luz UV y tras revelado con el reactivo A de Neu y polietilenglicol, de las manchas cromatográficas, así como su posible identificación.



a



b



c

Figura X.2.3: Cromatoplasmas de extractos etéreos de corteza de *E. globulus*. a: HEG4. b: PEG1. c: PEG5.

Tabla X.2.8: Componentes detectados en las placas de CCF de los extractos etéreos de corteza de *E. globulus*

Mancha Nº	Rf		Color UV	Revelado React.A+PEG	Posible identificación
	1ª Dim.	2ª Dim.			
1	0,50	0,20	Am-Az	Az	Ac. elágico
2	0,70	0,12	Az	Az	Elagitanino
3	0,94	0,02	-	Am	*
4	0,83	0,19	-	Am	Flavonol
5	0,88	0,31	-	Am	Quercetina
9	0,86	0,91	Ma-Mo	Ma-Mo	Ac. o Ald. fenólico
10	0,84	0,54	Az	Az	Elagitanino
11	0,92	0,64	-	Am	Flavanona
12	0,88	0,69	Az	Az	Elagitanino
13	0,84	0,82	Ma-Mo	Ma-Mo	Ac. o Ald. fenólico
14	0,82	0,62	Ma-Mo	Ma-Mo	Flavanona

Am = amarillo, Az = azul, Ma = marrón, Mo = morado; \* = no identificado.

También se han detectado elagitaninos, aunque se hace la misma consideración que en *E. camaldulensis*, respecto a las confirmaciones de estas identificaciones.

La tabla X.2.9 recoge la información relativa a la presencia o ausencia de cada componente en los extractos de corteza de *E. globulus*.

Tabla X.2.9: Distribución de los componentes detectados por CCF en los extractos etéreos de corteza de *E. globulus*

Nº	Componente	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	Ac. elágico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Elagitanino	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
3	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Flavonol	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
5	Quercetina	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
9	Ac. Ald. fenól.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Flavanona	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
12	Elagitanino	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
13	Ac. Ald. fenól.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	Ac. Ald. fenól.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

H = Huelva, P = Pontevedra, EG = *E. globulus*.

+ = presencia, - = ausencia; \* = no identificado.

En la medida de lo posible, se ha mantenido la misma

numeración para las manchas equivalentes a las de los extractos de corteza de *E. camaldulensis*.

No parecen existir unos componentes que marquen una clara diferencia entre muestras.

Quizás se puede destacar la muestra PEG4, como ejemplo de extracto pobre en compuestos fenólicos.

Aunque no se está desarrollando un análisis semicuantitativo por CCF, se puede comentar que, atendiendo al tamaño y a la intensidad de las manchas cromatográficas, los compuestos más abundantes, en los extractos etéreos de corteza de *E. globulus*, son los elagitaninos.

### 2.3.3. Hojas

La figura X.2.4 contiene la representación de unas cromatoplasmas modelo de extractos etéreos de hojas de *E. globulus*.

La tabla X.2.10 recoge los valores de  $R_f$  y las coloraciones, bajo luz UV y tras revelado con reactivo A de Neu y polietilenglicol, de las manchas correspondientes a los componentes presentes en estos extractos.

Tabla X.2.10: Componentes detectados en las placas de CCF de los extractos etéreos de hojas de <i>E. globulus</i>					
Mancha Nº	$R_f$		Color UV	Revelado React.A+PEG	Posible identificación
	1ª Dim.	2ª Dim.			
1	0,49	0,20	Az	Az	Ac. elágico
9	0,90	0,01	Ma	Ma	*
10	0,78	0,16	Az	Az	Elagitanino
11	0,71	0,45	-	Ve	*
12	0,83	0,58	Az	Az	Elagitanino
13	0,86	0,73	Az	Az	Elagitanino
14	0,84	0,83	Am	Am-Na	Flavonol

Am = amarillo, Az = azul, Ma = marrón, Mo = morado; \* = no identificado.

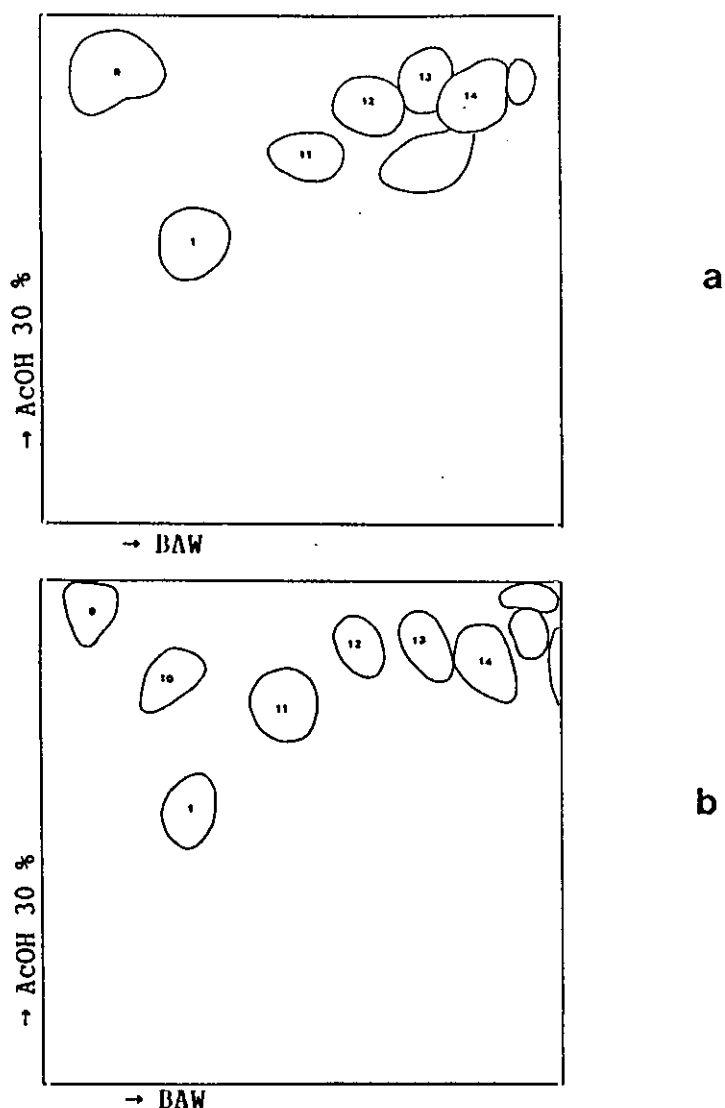


Figura X.2.4: Cromatoplasmas de extractos etéreos de hojas de *E. globulus*. a: HEG2. b: PEG4.

Se ha mantenido la misma numeración que para las hojas de *E. camaldulensis*.

Así como las cromatoplasmas de las hojas de *E. camaldulensis* se caracterizaban por unas amplias manchas difusas en la zona de los glicósidos flavonoídicos, las cromatoplasmas de hojas de *E. globulus* presentan, en la misma zona, una serie de manchas bien definidas. De ellas, una gran parte pertenece al grupo de los elagitaninos que estaban ausentes en *E. camaldulensis*. Como se ha

indicado anteriormente, no se aborda la identificación de los elagitaninos.

De los flavonoides detectados, el 14 puede ser un glicósido de quercetina, posiblemente quercitrina.

En la tabla X.2.11 se representa la distribución de estos componentes en las distintas muestras de hojas de *E. globulus*.

Tabla X.2.11: Distribución de los componentes detectados en CCF en los extractos de hojas de <i>E. globulus</i>											
Nº	Componente	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	Ac. elágico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Elagitanino	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
11	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	Flavonol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

H = Huelva, P = Pontevedra, EG = *E. globulus*.

+ = presencia, - = ausencia; \* = no identificado.

Se observa que los extractos de hojas de *E. globulus* dan lugar a unas cromatoplasmas sencillas, con poca variedad de flavanoles, al contrario que *E. camaldulensis*. Como en madera y corteza, los componentes más característicos de las hojas de *E. globulus* son los elagitaninos, con diversidad de estructuras que determinan la variedad de posiciones en las placas.

#### 2.3.4. Conclusiones

1. Los extractos de madera de *E. globulus* son más complejos que los de *E. camaldulensis*, por la presencia de flavanoles, ausentes en esta última especie. Las diferencias, entre unas muestras y otras, vienen dadas por las distribuciones de algunos elagitaninos y flavanoles.

2. No existen marcadas diferencias en los extractos de corteza de *E. globulus*. Los componentes más característicos

son los elagitaninos, pero, también, se ha detectado la presencia de flavonoles y ácidos fenólicos.

3. Las cromatoplasmas de extractos de hojas de *E. globulus* son más sencillas que las de *E. camaldulensis* en cuanto al contenido en flavonoles, aunque, por otra parte, contienen elagitaninos, ausentes en las hojas de *E. camaldulensis*.

#### 2.4. ANALISIS POR CLAR. IDENTIFICACIONES. VALORACIONES SEMICUANTITATIVAS

A continuación, se exponen los resultados, referentes a la aplicación de la CLAR a los extractos etéreos de las muestras de madera, corteza y hojas de *E. globulus*. Se incluyen las identificaciones directas, realizadas por CLAR, así como las más complejas que han requerido el apoyo de la CG-EM.

También, se desarrollan las valoraciones semicuantitativas, basadas en las medidas de las áreas de los picos cromatográficos.

##### 2.4.1. Madera

###### A) Identificaciones

La figura X.2.5 incluye cromatogramas modelo de extractos etéreos de muestras de madera de *E. globulus*.

En estos cromatogramas y en las tablas siguientes se ha mantenido la misma numeración que en madera de *E. camaldulensis*, citando solamente los compuestos detectados. Cuando se ha detectado algún componente nuevo, se ha nombrado con el mismo número del compuesto de *E. camaldulensis*, seguido de una letra.

En los extractos etéreos de madera de *E. globulus*, se han identificado de forma directa, por CLAR:

- Acido gálico (1)



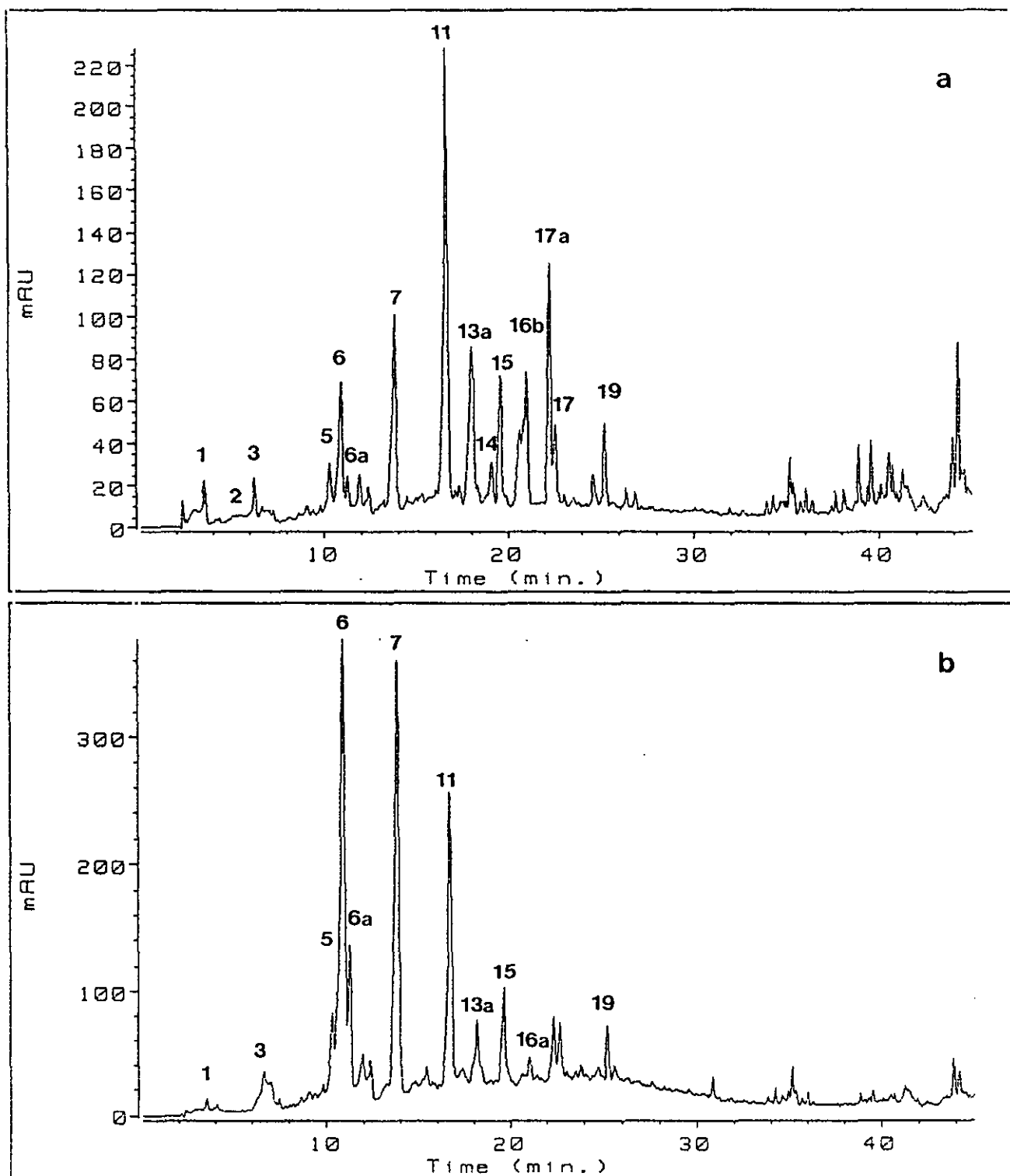


Figura X.2.5: Cromatogramas de extractos etéreos de madera de *E. globulus*. a: HEG3. b: PEG2. (Absorbancia a  $325 \pm 75$  nm).

- Ácido vainílico (4)
- Vainillina (5)
- Aldehído sirínico (6)
- Ácido elágico (11)
- Naringenina (16)
- Quercetina (16a)

Se han reconocido, por su espectro UV, algunos elagitaninos, constituidos por la unión del ácido elágico y azúcares. Esta unión no modifica el espectro UV del ácido original.

Se han detectado también, por su espectro UV, dos flavonoles, aunque no ha sido posible su identificación.

La identificación del pico 7 como derivado de ácido o aldehído sirínico, ya ha sido desarrollada en el apartado X.1.4.1., de madera de *E. camaldulensis*.

#### B) Valoraciones semicuantitativas

La tabla X.2.12 reúne los resultados de las valoraciones semicuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de madera de *E. globulus*. El Apéndice II contiene los valores de áreas de los picos cromatográficos, en unidades de integración.

Entre las muestras de Huelva y de Pontevedra, se observan las siguientes diferencias:

- La concentración de ácidos y aldehídos fenólicos es mayor en las muestras de Pontevedra. La diferencia es especialmente notable en el caso del aldehído sirínico, aunque ya se detecta con claridad para la vainillina.
- La variedad y concentración de flavonoles es mayor en las muestras de Huelva.

Los elagitaninos no marcan una diferencia sustancial entre

muestras, como ocurría en el caso de *E. camaldulensis*.

Tabla X.2.12: Valoración semicuantitativa por CLAR de los componentes de los extractos etéreos de madera de *E. globulus*

Pico	Componente	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	Ac. gálico	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+
2	*	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
3	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Ac.vainíll.	-	-	-	-	-	-	-	+	t	+
5	Vainillina	+	+	+	+	+	++	++	+	+	++
6	Ald.siring.	++	+	++	++	++	++++	++++	+++	++	++++
6a	*	+	-	+	+	-	-	++	-	-	+
7	Der.siring.	++	++	++	+++	++	++++	++++	+++	+++	++++
11	Ac. elágico	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++++
13a	Elagitanino	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++
13b	Flavonol	t	t	-	-	+	+	+	+	+	+
14	Elagitanino	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
15	Elagitanino	+	+	++	+++	++	++	++	++	++	+++
16	Naringenina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
16a	Quercetina	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
16b	Elagitanino	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
17a	Flavonol	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
17	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	-	+	+	++
19	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	+	+	++	+

H = Huelva, P = Pontevedra; EG = *E. globulus*; t = trazas; \* = no identificado.

Al comparar los resultados obtenidos con maderas de *E. globulus* y *E. camaldulensis*, se observa que:

- Los altos contenidos de ácidos y aldehídos fenólicos, en las muestras de *E. globulus* de Pontevedra, se asemejan a los de las muestras HEC2 y HEC3 de *E. camaldulensis*, y los de las muestras de Huelva son similares a los de las maderas de *E. camaldulensis* de Pontevedra.

- Las muestras de *E. camaldulensis* difieren de las *E. globulus* en las ausencias: de flavonoles, en la primera especie, y de flavanonas, en la segunda.

#### 2.4.2. Corteza

La figura X.2.6 contiene dos cromatogramas modelo de extractos etéreos de corteza de *E. globulus*.

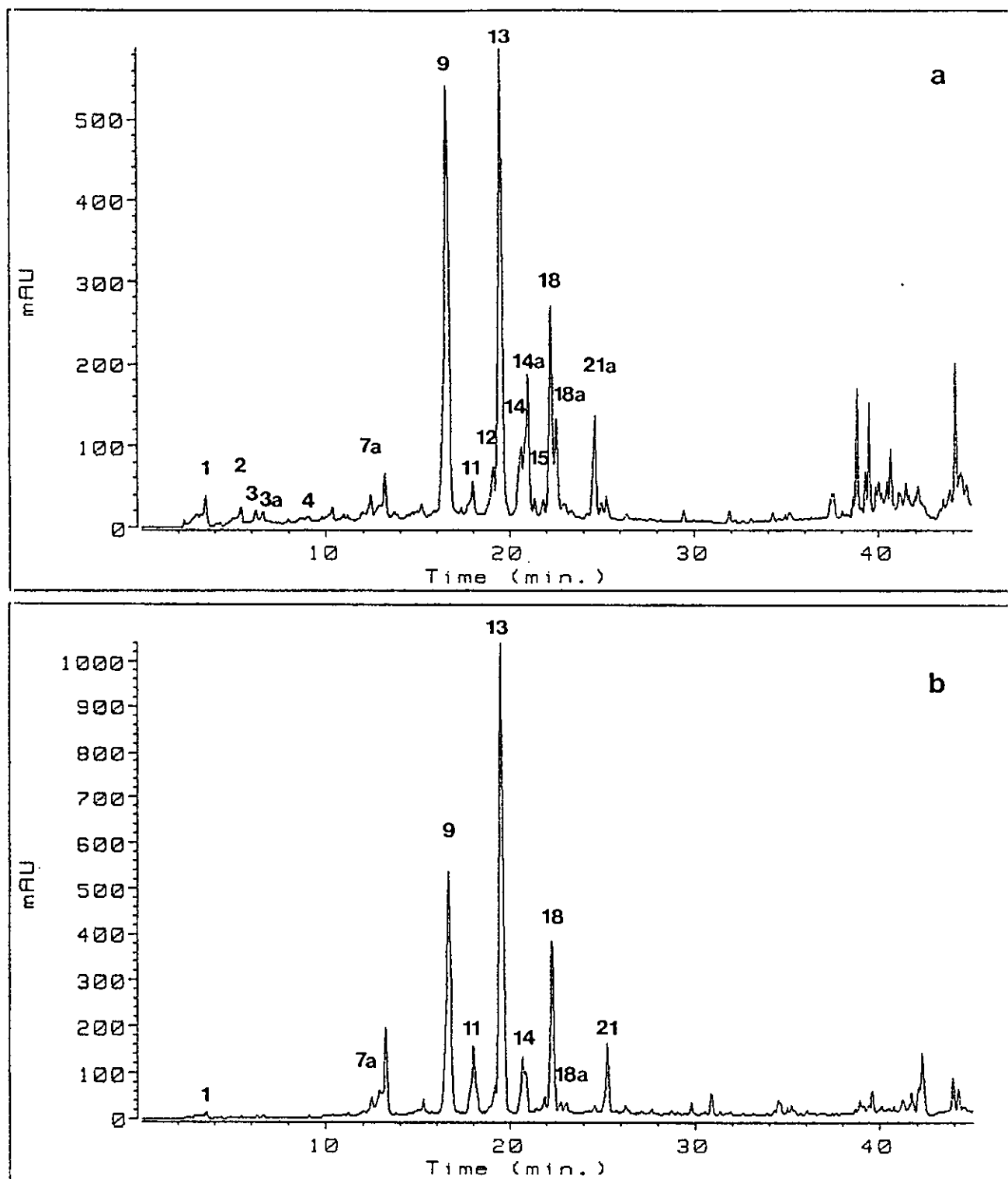


Figura X.2.6: Cromatogramas de extractos etéreos de corteza de *E. globulus*. a: HEG2. b: PEG3. (Absorbancia a  $325 \pm 75$  nm).

En esta figura y en las tablas siguientes, se mantiene la misma numeración que en *E. camaldulensis*, con el mismo criterio que se siguió en madera, para la denominación de los picos detectados por primera vez.

En estos extractos, se han identificado directamente, por CLAR:

- Acido gálico (1)
- Acido protocatéquico (2)
- Aldehído protocatéquico (3a)
- Acido vainíllico (4)
- Taxifolina (7a)
- Acido elágico (9)
- Eriodictyol (11)
- Quercetina (14)
- Naringenina (15)
- Apigenina (20a)

También se han reconocido, por su espectro UV, elagitaninos y un flavonol.

#### B) Valoraciones semicuantitativas

La tabla X.2.13 reúne los resultados de la valoración semicuantitativa de los componentes, presentes en los extractos etéreos de corteza de *E. globulus*. En el Apéndice II, se reúnen los valores de áreas de los picos cromatográficos, en unidades de integrador.

Las composiciones de los extractos de corteza de *E. globulus* son comparables con las de los de cortezas de otras especies; pero no con los de maderas y hojas, como ya se comentó para *E. camaldulensis*.

Tabla X.2.13: Valoración semicuantitativa por CLAR de los componentes de los extractos etéreos de corteza de *E. globulus*

Nº	Componente	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	Ac. gálico	+	+	+	+	+	+	+	+	t	+
2	Ac.protoc.	+	+	+	+	t	-	-	-	-	-
3	*	-	+	-	+	t	-	-	-	-	-
3a	Ald.proto.	+	+	+	+	t	-	-	-	-	-
4	Ac.vainíl.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7a	Taxifolina	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
9	Ac.elágico	++++	++++	+++	+++	+++	++++	+++	+++	++++	++
11	Eriodict.	+	+	+	++	+	-	++	++	+	+
12	Elagitan.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
13	Elagitan.	++++	++++	+++++	+++++	+++++	+	++++	+++++	+++++	++++
14	Quercetina	-	++	+	+	+	-	+	++	-	+
14a	Elagitan.	+	++	++	+	+	-	+	-	-	-
15	Naringen.	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
18	Flavonol	-	++	+++	++	++	-	++	+++	+	-
18a	Elagitan.	++	+	+	+	-	-	+	+	+	+++
20a	Apigenina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
21a	Elagitan.	-	++	+	-	-	-	+	-	-	-
21	Elagitan.	+	-	+	+	+	-	-	++	+	+

H = Huelva, P = Pontevedra; EG = *E. globulus*; t = trazas; \* = no identificado

Las muestras de Huelva difieren claramente de las de Pontevedra por su mayor concentración en ácidos y aldehídos fenólicos. La única excepción es el ácido elágico, que presenta valores semejantes en ambos tipos de muestras.

No existen grandes diferencias entre las muestras de ambas procedencias, en cuanto a la composición de los grupos de flavonoles, flavanonas y flavonas, los cuales no presentan un claro patrón de distribución. La muestra PEG1 mostró un comportamiento anómalo, por carecer de flavonoles y flavonas; solamente contiene ácido gálico, ácido elágico, taxifolina y un elagitanino (13).

No se observa relación entre las concentraciones de quercetina y taxifolina (dihidroquercetina).

El componente más abundante, junto al ácido elágico, en la mayoría de las muestras, es el elagitanino 13 que, en algunos casos, presenta concentraciones, incluso, superiores a las del

ácido elágico.

Al comparar los extractos de corteza de *E. globulus* con los de *E. camaldulensis*, se aprecian las siguientes diferencias:

- La presencia de un dihidroflavonol (taxifolina) en *E. globulus*.
- La elevada concentración del elagitanino 13 en las cortezas de *E. globulus*.
- Una menor concentración de ácidos y aldehídos fenólicos en las cortezas de *E. globulus*, que en las de *E. camaldulensis* de Huelva.

#### 2.4.3. Hojas

##### A) Identificaciones

La figura X.2.7 reúne cromatogramas modelo de extractos etéreos de hojas de *E. globulus*.

Se mantiene la misma numeración que para *E. camaldulensis*, con el mismo criterio que en madera y corteza respecto a los nuevos picos detectados.

Se han identificado directamente, por CLAR:

- Ácido gálico (1)
- Vainillina (3)
- Ácido elágico (8)
- Luteolina (14)
- Apigenina (19a)

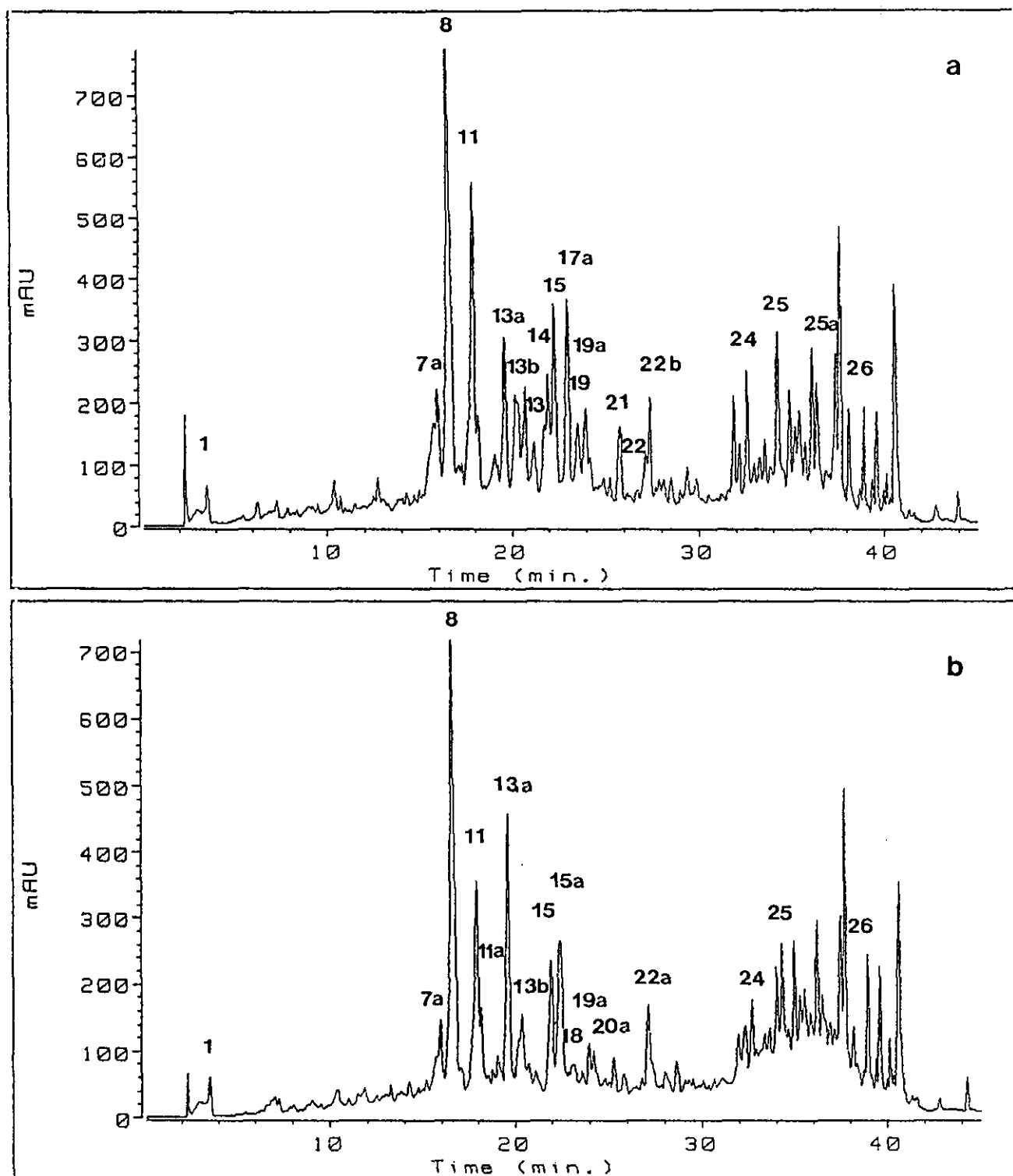


Figura X.2.7: Cromatogramas de extractos etéreos de hojas de *E. globulus*. a: HEG3. b: PEG2. (Absorbancia a  $325 \pm 75$  nm).



Por su espectro UV, se han reconocido elagitaninos y una flavanona. Se han detectado también dos compuestos, derivados de apigenina y kaempferol. El pico 17a, con un  $t_R$  inferior al de la apigenina y un espectro semejante a ella, podría ser un derivado glicosilado de ésta. El pico 22b, con un  $t_R$  superior al del kaempferol y un espectro semejante, podría ser un derivado metilado de éste. No se ha considerado necesario profundizar en la identificación de estos compuestos, al estar en muy baja concentración y en un pequeño número de muestras.

Los extractos de hojas de *E. globulus* presentan gran número de picos en la zona final de sus cromatogramas. Estos picos tienen un máximo de absorción a 280 nm y un hombro a 340 nm. No se ha conseguido determinar su estructura.

\* Identificación de 25a

El análisis, por CG-EM, de este compuesto demostró que presentaba una estructura semejante a la de los picos 24, 25 y 26 que se detectaron en *E. camaldulensis*, a los que se asignó naturaleza sesquiterpénica.

B) Valoraciones semicuantitativas

La tabla X.2.14 reúne los resultados de las valoraciones semicuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de hojas de *E. globulus*. Los valores de las áreas de los picos, en unidades de integrador, se han reunido en el Apéndice II.

Como ya se ha comentado en el apartado de *E. camaldulensis*, esta tabla no es comparable con las correspondientes de madera y corteza, ni en las concentraciones relativas ni en la numeración de los picos.

Tabla X.2.14: Valoración semicuantitativa por CLAR de los componentes de los extractos etéreos de hojas de *E. globulus*

Pico	Componente	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	Ac. gálico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Vainillina	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
7a	*	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+
8	Ac. elágico	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
11	Quercitrina	+	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++
11a	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
13a	Elagitanino	+++	+++	++	++	++++	+	++	++	++	+++
13b	*	++	++	++	++	++	+	+	+	+	++
13c	*	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
13	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	Luteolina	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
15	*	++	++	++	+++	-	++	++	+	++	++
15a	Elagitanino	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-
17a	Der. apigenina	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
18	*	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
19	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19a	Apigenina	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
20b	Elagitanino	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
21	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	*	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
22a	Flavanona	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
22b	Der.kaempferol	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
24	Sesquiterp.(?)	+	-	+	++	+	-	+	+	+	+
25	Sesquiterp.(?)	+	+	++	++++	++	+	+	++	++	+
25a	Sesquiterp.(?)	-	+	+	-	++	-	-	-	+	-
26	Sesquiterp.(?)	-	+	+	+	++	+	+	+	+	-

H = Huelva, P = Pontevedra; EG = *E. globulus*; t = trazas; \* = no identificado.

De la observación de los cromatogramas y de los resultados de las valoraciones semicuantitativas, mostrados en la tabla X.2.14 se puede deducir que no existen grandes diferencias en la composición de los extractos etéreos de hojas de *E. globulus* de ambas procedencias. Los grupos de elagitaninos, flavonas y flavanonas presentan distribuciones semejantes en las muestras procedentes de Huelva y Pontevedra. Son extractos pobres en ácidos fenólicos. Sólo se ha detectado la presencia de ácido gálico y ácido elágico, aunque este último, como casi siempre, constituye uno de los componentes mayoritarios de los extractos.

Además del ácido elágico, son componentes mayoritarios la quercitrina (pico 11) y el elagitanino 13a.

Al comparar estos extractos con los de hojas de *E. camaldulensis*, se observa que estos últimos contienen una mayor variedad y cantidad de flavonoles, mientras que los de *E. globulus* se caracterizan por un mayor contenido de elagitaninos.

#### 2.4.4. Conclusiones

1. Como en el caso de *E. camaldulensis*, el contenido y variedad de ácidos fenólicos es mayor en los extractos de madera y corteza, que en los de las hojas.

2. A diferencia de *E. camaldulensis*, se ha detectado la presencia de flavonoles y flavanonas en los tres tipos de extractos. La variedad de glicósidos de flavonol en hojas de *E. globulus* es mucho menor que en *E. camaldulensis*.

3. No se observan grandes diferencias de composición entre las muestras de *E. globulus* de Huelva y de Pontevedra en ninguno de los tres tejidos estudiados.

#### 2.5. VALORACIONES CUANTITATIVAS

En este apartado, se reúnen los resultados de la cuantificación de los componentes de los extractos de madera, corteza y hojas de *E. globulus*, por el método del patrón externo. Las rectas de calibración fueron elaboradas con los patrones comerciales de los compuestos correspondientes.

Tabla X.2.15: Valoraciones cuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de madera de *E. globulus*

Componente	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
Ac.gálico										
μg/ml	10,2	9,2	27,6	22,8	38,8	39,8	7,0	1,2	11,2	2,0
μg/g sec.	2,9	2,5	7,7	6,3	10,7	25,4	2,1	0,3	3,2	0,6
Vainillina										
μg/ml	5,1	2,0	4,1	16,0	21,7	64,5	53,1	31,4	19,9	47,1
μg/g sec.	1,4	0,5	1,1	4,4	6,0	18,3	15,7	9,3	5,8	13,6
Ac.elágico										
μg/ml	126,7	130,7	123,7	159,7	160,4	287,7	156,3	159,6	150,9	212,2
μg/g sec.	35,5	35,9	34,3	44,3	44,5	81,6	46,3	47,3	44,2	61,5
Naringen.										
μg/ml	0	0	22,0	0	0	0	0	0	0	0
μg/g sec.	0	0	6,1	0	0	0	0	0	0	0
Quercetina										
μg/ml	0	t	t	0	0	0	0	0	0	0
μg/g sec.	0	Nc	Nc	0	0	0	0	0	0	0

t = trazas, Nc = No cuantificable

Tabla X.2.16: Valoraciones cuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de corteza de *E. globulus*

Componente	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
Ac. gálico μg/ml	36,9	66,2	84,1	48,3	18,1	46,6	t	0,8	t	t
μg/g sec.	26,7	47,5	59,7	35,0	13,4	30,0	Nc	0,5	Nc	Nc
Ac. protoc. μg/ml	24,5	38,0	41,1	11,3	t	0	0	0	0	0
μg/g sec.	17,7	27,2	29,2	8,2	Nc	0	0	0	0	0
Ald. proto. μg/ml	19,7	11,1	10,9	6,1	1,5	0	0	0	0	0
μg/g sec.	14,3	8,0	7,7	4,4	1,1	0	0	0	0	0
Ac. elágico μg/ml	274,4	339,5	189,2	231,7	185,5	355,4	238,0	319,3	264,2	131,2
μg/g sec.	198,9	243,3	134,2	167,9	137,4	229,3	133,6	185,1	200,1	76,1
Eriodict. μg/ml	57,4	151,7	131,0	309,6	66,2	0	253,4	382,8	89,6	221,8
μg/g sec.	41,6	108,7	93,0	224,3	49,0	0	142,2	222,0	67,9	128,5
Quercetina μg/ml	0	22,7	t	t	t	0	32,6	77,2	0	t
μg/g sec.	0	16,3	Nc	Nc	Nc	0	18,3	44,7	0	Nc
Naringen. μg/ml	0	22,7	0	6,7	2,9	0	1,6	0	0	3,0
μg/g sec.	0	16,2	0	4,9	2,1	0	0,9	0	0	1,7
Apigenina μg/ml	0	0	0	0	0	0	11,9	0	0	23,6
μg/g sec.	0	0	0	0	0	0	6,6	0	0	13,7
Taxifolina μg/ml	0	48,3	18,9	53,5	0	17,0	22,9	49,6	8,1	37,0
μg/g sec.	0	34,6	13,4	38,8	0	11,0	12,9	28,8	6,1	21,4

t = trazas, Nc = No cuantificable

Tabla X.2.17: Valoraciones cuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de hojas de *E. globulus*

Componente	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
Ac. gálico μg/ml	105,6	141,3	150,3	186,2	161,8	60,3	125,4	114,5	94,1	101,6
μg/g sec.	29,3	39,3	40,9	51,1	40,0	17,5	32,7	29,9	26,7	29,4
Vainillina μg/ml	0	0	0	0	0	43,9	0	0	0	0
μg/g sec.	0	0	0	0	0	12,7	0	0	0	0
Ac.elágico μg/ml	489,6	445,9	505,8	419,4	527,2	353,6	454,5	457,3	515,1	492,6
μg/g sec.	136,0	123,8	137,6	115,3	130,4	102,5	118,6	119,3	146,1	142,8
Quercitri. μg/ml	155,6	486,1	507,8	580,7	347,2	220,2	356,1	317,8	371,2	226,2
μg/g sec.	43,2	135,0	138,2	159,6	85,9	62,8	92,9	82,9	105,3	65,5
Luteolina μg/ml	114,8	158,5	172,3	183,7	206,8	0	0	154,4	0	0
μg/g sec.	31,9	44,0	46,9	50,5	51,2	0	0	40,3	0	0
Apigenina μg/ml	113,9	78,5	162,4	0	0	0	79,9	56,4	0	0
μg/g sec.	31,6	21,8	44,2	0	0	0	20,8	14,7	0	0

t = trazas, Nc = no cuantificable

### 3. *EUCALYPTUS RUDIS* ENDL.

#### 3.1. CARACTERIZACION DE MUESTRAS

##### 3.1.1. Caracterización de hojas. Análisis de aceites esenciales

La tabla X.3.1 muestra la composición química de los aceites esenciales de *E. rudis* y los rendimientos de destilación. Como en las tablas correspondientes de *E. camaldulensis* y *E. globulus*, la concentración de cada componente se expresa en porcentaje de área de su pico cromatográfico. A continuación, la figura X.3.1 incluye tres cromatogramas tipo de muestras de aceites esenciales de *E. rudis*.

Los únicos datos conocidos, sobre la composición química de los aceites esenciales de *E. rudis*, son los aportados por BAKER y SMITH (1920), reproducidos posteriormente en los Tratados generales sobre el género *Eucalyptus* (PENFOLD y WILLIS, 1961; DE LA LAMA GUTIERREZ, 1976) y en los relativos a los aceites esenciales (GILDEMEISTER y HOFFMANN, 1961; GUENTHER, 1965). Dichos autores identificaron 1,8-cineol (valorado por métodos químicos clásicos en ca. 40 %) y *d*- $\alpha$ -pineno. También detectaron aldehídos volátiles en cantidad importante, ésteres de alto punto de ebullición y un sesquiterpeno en pequeña concentración, más 0,18 % de fenoles, entre los que identificaron, como probable, el australol.

El 1,8-cineol y el  $\alpha$ -pineno, compuestos característicos de la mayoría de las esencias de eucalipto, están presentes en todas las muestras, pero aparecen solamente como componentes mayoritarios en cinco de ellas (HER1-HER4 y PER3).

El espatulenol es el componente mayoritario en HER5, compartiendo importancia con criptona y *p*-cimeno en PER1, PER2 y PER4.

Tabla X.3.1: Composición de los aceites esenciales de hojas de *Eucalyptus rudis*

		Concentración (%)									
Pico	Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4	
1	Aldehído iso-valerianico	3,6	4,7	t	0,2	0,6	0,1	t	0,3	t	
2	Alcohol iso-amílico	1,8	1,5	0,6	0,4	t	t	t	t	t	
3	$\alpha$ -Pinoeno	8,7	16,3	13,1	10,4	1,8	0,2	0,6	9,3	0,2	
4	$\beta$ -Pinoeno	0,6	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	
5	Mirceno	0,5	0,9	0,5	0,2	t	0,1	0,2	0,6	0,1	
6	Limoneno	2,0	2,6	4,0	2,9	2,6	0,4	1,5	5,7	0,9	
7	$\beta$ -Felandreno	0,0	0,0	0,0	0,0	t	0,2	0,6	0,0	0,4	
8	1,8-Cineol	77,8	65,2	60,8	67,2	7,4	1,8	5,9	61,7	3,6	
9	p-Cimeno	0,2	0,2	0,4	0,6	1,3	5,4	16,3	0,5	5,1	
10	Linalol	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,0	2,2	0,3	1,4	
11	Acetato linalilo	t	t	t	t	t	0,6	0,2	t	0,5	
12	Pinocarvona	0,4	0,3	0,7	0,9	t	1,0	1,2	0,3	0,8	
13	Aromadendreno	0,3	0,4	1,2	0,8	0,4	0,0	0,0	0,7	0,1	
14	Terpinen-4-ol	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	3,2	5,4	0,4	1,9	
15	Alloaromadendreno	0,2	0,1	0,4	0,3	0,7	0,8	0,4	0,2	2,2	
16	Mirtenal	0,1	t	0,2	0,2	t	0,9	1,0	0,2	0,8	
17	trans-Pinocarveol	1,5	1,0	1,9	3,1	0,1	t	0,2	0,6	t	
18	Criptona	0,2	0,2	0,2	0,2	t	9,4	13,9	0,2	7,0	
19	$\alpha$ -Terpineol	1,0	1,2	1,4	0,7	0,6	1,5	4,6	1,7	3,0	
20	Felandral	t	t	t	t	t	0,8	2,2	t	1,1	
21	Alcohol monoterpén.	0,4	0,4	1,0	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	
22	Aldehído cumínico	t	t	t	t	t	2,6	3,2	t	2,4	
23	Mirtenol	0,4	0,2	0,4	0,6	t	0,2	0,2	0,2	0,2	
24	p-Cimen-8-ol	t	t	t	t	t	0,6	0,7	t	0,8	
25	Oxido cariofileno	t	t	0,2	0,2	0,6	0,1	t	0,3	0,1	
26	Alcohol sesquiterp.	t	t	0,2	0,2	1,3	0,9	0,6	0,4	1,4	
27	Viridiflorol	0,8	0,7	4,3	3,4	4,7	1,6	1,8	6,2	1,8	
28	$\beta$ -Eudesmol	0,2	0,2	0,8	0,8	t	t	t	1,0	0,6	
29	Ledol	0,1	0,1	0,5	0,4	t	1,1	1,2	0,8	1,9	
30	Alcohol cumínico	0,0	0,0	t	0,0	0,6	0,2	0,2	0,0	0,7	
31	Espatulanol	t	t	0,4	0,2	48,7	37,1	15,5	0,5	26,2	
32	Alcohol sesquiterp.	0,0	0,0	t	t	0,7	1,4	1,4	t	1,9	
33	Timol	t	t	t	0,1	0,9	0,6	0,6	t	2,4	
34	Alcohol sesquiterp.	t	t	t	t	1,6	0,9	0,3	t	1,1	
35	Carvacrol	t	t	0,1	0,1	0,2	0,8	0,8	0,3	2,4	
36	$\alpha$ -Cadinol	t	t	0,1	t	3,2	0,6	0,3	0,2	1,9	
37	Alcohol sesquiterp.	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	1,4	0,6	0,0	1,9	
38	Comp. carbonílico	0,0	0,0	t	t	1,6	4,0	2,8	0,0	5,4	
39	Comp. carbonílico	0,0	0,0	t	0,0	0,2	2,8	0,7	0,0	3,1	
Rendimiento (%)		2,98	3,51	3,52	2,45	0,87	1,52	0,91	1,45	0,85	

H = Huelva, P = Pontevedra, ER = *E. rudis*.

t = trazas (<0,1 %); 0,0 = no detectado.



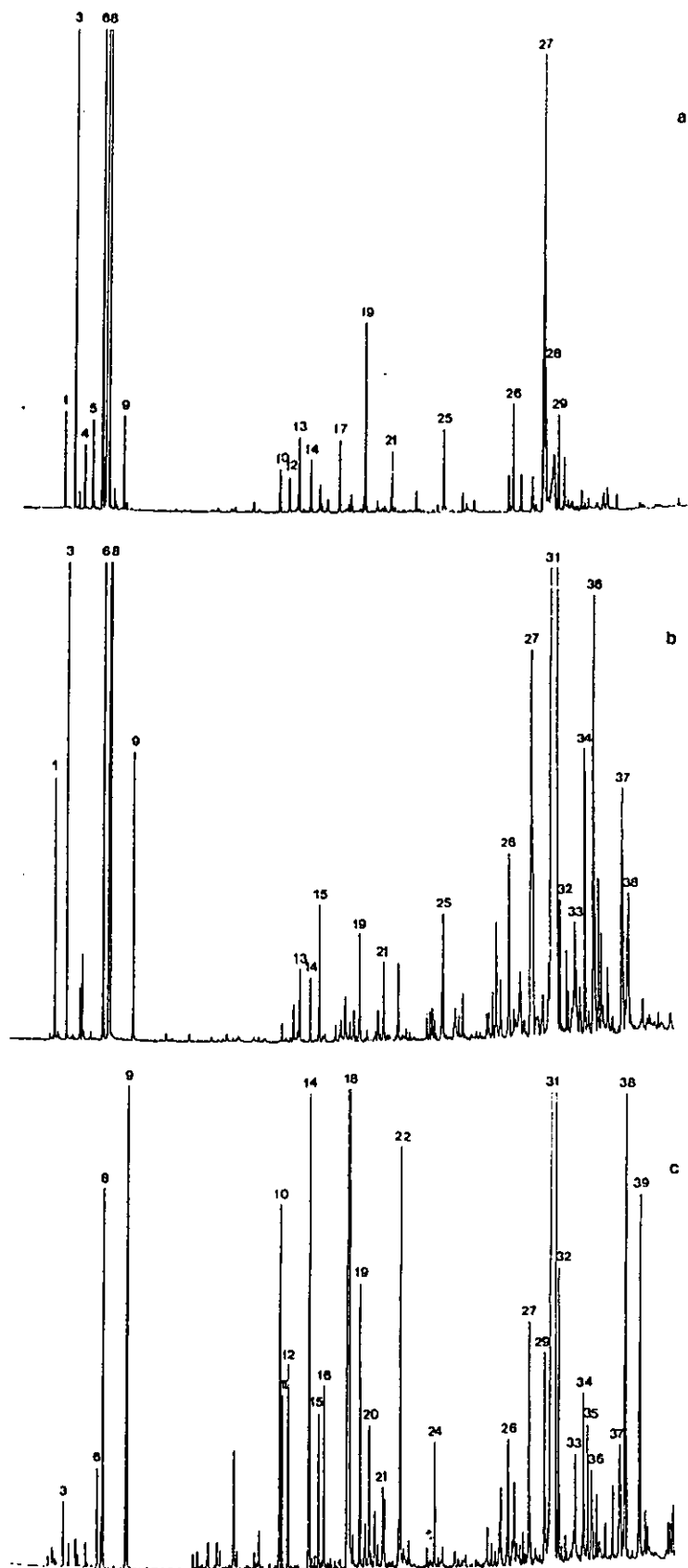


Figura X.3.1: Cromatogramas de aceites esenciales de *E. rudis*. a: PER3. b: HER5. c: PER1.

Las muestras ricas en 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno dieron rendimientos mayores de aceites esenciales.

### 3.1.2. Caracterización de maderas. Determinaciones químicas. Normas

La tabla X.3.2 recoge los resultados de los análisis normalizados de madera de *E. rudis*, para la determinación de cenizas, solubilidades en agua fría y caliente y en sosa, contenidos en holocelulosa, ligninas y pentosanos. Estos ensayos se utilizan para valorar la calidad de la madera como materia prima para la obtención de pasta de celulosa.

Tabla X.3.2: Análisis químico de maderas de <i>E. rudis</i>									
Muestra	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
Extracto alcohol-benceno	1,94	2,97	3,05	2,43	2,67	1,80	2,90	1,70	2,12
Cenizas	0,58	0,53	1,12	0,70	1,23	0,67	0,71	0,65	0,24
Solub. agua fría	3,23	3,92	6,16	4,41	8,46	4,68	6,38	3,62	4,94
Solub. agua cal.	4,12	4,93	5,61	5,13	8,17	4,85	6,86	4,77	4,22
Solub. sosa	14,47	15,13	18,48	16,53	20,31	17,92	19,24	17,64	18,43
Holocel.	83,10	82,76	81,51	84,19	82,71	83,45	81,82	83,47	83,42
Ligninas	22,65	23,05	25,06	23,40	21,50	24,12	21,07	24,04	26,94
Pentosanos	19,01	17,59	20,22	17,95	19,28	19,60	19,68	19,56	21,27

H = Huelva, P = Pontevedra, ER = *E. rudis*

Los resultados que muestran BUSTAMANTE EZPELETA y SANTOS VIQUEIRA (1983) sobre los análisis químicos de madera de *E. rudis* son diferentes a los obtenidos con las muestras objeto de este estudio. Estas últimas parecen presentar mejores propiedades como materia prima celulósica, ya que muestran menores valores de solubilidades en agua fría y caliente y en sosa, menor contenido de extractos en alcohol-benceno y de ligninas, y considerablemente mayores contenidos de holocelulosa. Por otro lado, los contenidos de pentosanos y, en algunos casos, de cenizas, son ligeramente superiores a los bibliográficos.

Los resultados respecto a las distintas variables son:

1. Extractos en alcohol-benceno. Como ya se ha comentado, valores altos de extractos en alcohol-benceno indican una baja calidad de la madera para la producción de pasta. Las maderas de *E. rudis* dieron valores más altos que las de *E. globulus* y *E. camaldulensis* de Pontevedra y menores que las de *E. camaldulensis* de Huelva. No existen diferencias importantes entre muestras, aunque podemos señalar que el máximo corresponde a la muestra HER3.

2. Cenizas. Las muestras de *E. rudis* presentan valores bajos de carga inorgánica, algo inferiores a los de las otras especies estudiadas. Los valores máximos se obtuvieron con HER3 y HER5.

3. Solubilidades en agua fría y caliente. Valores altos de estas variables representan bajos rendimientos en pasta de papel. Las muestras de *E. rudis* presentan un amplio rango de variación de solubilidades. Tres de las muestras (HER3, HER5 y PER2) se diferencian del resto, por los valores superiores que se aproximan a los que alcanzaban las maderas de *E. camaldulensis* de Huelva.

4. Solubilidad en sosa. Las maderas de *E. rudis* presentan un rango de variación en las solubilidades en sosa bastante amplio. El valor máximo de la muestra HER5 podría justificarse suponiendo que ha experimentado algún tipo de degradación o ataque microbiano, pero el hecho de presentar valores altos en las demás variables, hace pensar que se trata de una madera de baja calidad.

No se observan grandes diferencias al comparar esta variable en las tres especies analizadas.

5. Holocelulosa y pentosanos. Las muestras de *E. rudis* presentan valores de holocelulosa semejantes a los de *E.*

*globulus* y *E. camaldulensis* de Pontevedra. Aunque el rango de variación es pequeño, se puede comentar que nuevamente son HER3, HER5 y PER2 las muestran con menor contenido en holocelulosa y, por ello, de peor calidad.

La variabilidad del contenido en pentosanos de las maderas de *E. rudis* es pequeña, siendo estos valores más próximos a los de *E. camaldulensis* que a los de *E. globulus*.

6. Ligninas. Una eliminación cuantitativa de ligninas es fundamental para la obtención de pasta de buena calidad. Por ello, cuanto mayor es el contenido de lignina más difícil es el proceso. Se puede destacar que el máximo contenido en ligninas de todas las muestras de las tres especies analizadas corresponde a PER4. Por lo general, podemos decir que *E. rudis* presenta contenidos de ligninas relativamente altos, semejantes a los de *E. camaldulensis* de Huelva.

### 3.1.3. Conclusiones

1. El análisis de los aceites esenciales de las hojas de *E. rudis* permite la clasificación de las muestras en tres tipos principales, según sus componentes mayoritarios: aquellas ricas en espatulenol (HER5); en espatulenol, criptona y *p*-cimeno (PER1, PER2 y PER4); y en 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno (HER1-HER4 y PER3).

2. El análisis de la madera no permite agrupar las muestras de *E. rudis*, si bien distingue a tres de ellas: HER3, HER5 y PER2, como las de peor calidad para la obtención de pasta de papel.

### 3.2. EXTRACCION. VALORACION DE CONTENIDO EN FENOLES TOTALES DE LOS EXTRACTOS

Las tablas X.3.3, X.3.4 y X.3.5 contienen los rendimientos de extracción con MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20) y del fraccionamiento de los

extractos con éter etílico (extracto etéreo), de las muestras de madera, corteza y hojas de *E. rudis*, así como los contenidos en fenoles totales de dichos extractos.

### 3.2.1. Madera

Tabla X.3.3: Rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales de las muestras de madera de <i>E. rudis</i>			
Muestra	Extracto en MeOH-H <sub>2</sub> O (%)	Extracto en éter etílico (%)	Fenoles totales mg(c.q.)/g (*)
HER1	3,41	0,27	7,62
HER2	4,31	0,33	12,43
HER3	4,98	0,28	12,75
HER4	4,17	0,25	13,58
HER5	6,02	0,26	9,22
PER1	4,47	0,22	8,10
PER2	5,60	0,30	18,34
PER3	3,55	0,30	9,41
PER4	3,15	0,47	11,95

H = Huelva, P = Pontevedra, ER = *E. rudis*; (\*) c.q. = calculado en quercetina.

En conjunto, no existen grandes diferencias en los rendimientos globales de extracción de las muestras de ambas procedencias. Lo mismo ocurre con los rendimientos etéreos, sobre todo si no se tiene en cuenta PER4, cuyo rendimiento etéreo está muy por encima de la media.

Los contenidos de fenoles totales no presentan ninguna relación de proporcionalidad con las anteriores variables.

### 3.2.2. Corteza

Resulta sorprendente la gran diferencia entre los rendimientos globales y etéreos de las muestras de Huelva y las de Pontevedra. Asimismo, comparando los valores de los rendimientos globales con los de las cortezas de las otras dos especies analizadas, se observa que los de *E. rudis* de Huelva presentan los valores más bajos, únicamente comparables a los de *E. camaldulensis* de Pontevedra. Sin embargo, los rendimientos

etéreos de las cortezas de *E. rudis* de Pontevedra son los más altos de las tres especies.

Tabla X.3.4: Rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales de las muestras de corteza de <i>E. rudis</i>			
Muestra	Extracto en MeOH-H <sub>2</sub> O (%)	Extracto en éter etílico (%)	Fenoles totales mg(c.q.)/g (*)
HER1	3,18	0,76	2,77
HER2	2,03	0,65	4,82
HER3	1,33	0,79	1,95
HER4	2,40	0,78	4,43
HER5	2,27	0,90	3,08
PER1	16,92	1,93	7,63
PER2	15,90	3,56	7,47
PER3	3,53	1,63	1,49
PER4	11,79	3,75	8,33

H = Huelva, P = Pontevedra, ER = *E. rudis*; (\*) c.q. = calculado en quercetina.

Los contenidos en fenoles totales tampoco presentan relación alguna de proporcionalidad con los rendimientos de extracción.

### 3.2.3. Hojas

Tabla X.3.5: Rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales de las muestras de hojas de <i>E. rudis</i>			
Muestra	Extracto en MeOH-H <sub>2</sub> O (%)	Extracto en éter etílico (%)	Fenoles totales mg(c.q.)/g (*)
HER1	29,44	0,82	61,82
HER2	30,66	0,57	55,15
HER3	17,33	1,24	53,91
HER4	26,35	2,32	63,19
HER5	32,76	0,82	65,75
PER1	26,87	1,97	63,64
PER2	28,41	0,76	74,72
PER3	25,50	2,19	47,13
PER4	30,10	2,40	65,89

H = Huelva, P = Pontevedra, ER = *E. rudis*; (\*) c.q. = calculado en quercetina.

Como en las especies anteriormente estudiadas, las hojas presentan los mayores rendimientos globales de extracción entre los tejidos analizados, si bien el rango de variación, sobre todo

en las muestras de Huelva, es muy grande (17-32 %).

No existe tampoco relación de proporcionalidad entre rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales.

#### 3.2.4. Conclusiones

1. Los valores mínimos de rendimientos etéreos corresponden a las maderas. Los rendimientos globales y los contenidos en fenoles totales más bajos se han encontrado en las cortezas de Huelva, cuyos extractos parecen ser bastante pobres en polifenoles. Estos resultados no coinciden con los obtenidos en las otras dos especies estudiadas.

2. Existen marcadas diferencias entre las cortezas de Huelva y las de Pontevedra. Sin embargo, los extractos de madera y hojas parecen menos variables.

3. Resultan sorprendentes los bajos contenidos en fenoles de las muestras de corteza de *E. rudis*, en comparación con las otras dos especies. Puesto que el contenido en fenoles de las cortezas de *E. rudis* es, incluso, inferior al de las maderas de las mismas muestras, cabe pensar que las características de estas cortezas son marcadamente distintas a las de las otras dos especies.

#### 3.3. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Teniendo en cuenta las mismas consideraciones expuestas para *E. camaldulensis* y *E. globulus*, en relación con la finalidad de la utilización de la CCF en este trabajo, se procede a exponer los resultados del análisis de los extractos etéreos de madera, corteza y hojas de *E. rudis* por CCF. Las condiciones de trabajo son iguales a las utilizadas con las muestras de los otros dos eucaliptos.

### 3.3.1. Madera

En la figura X.3.2 se muestran las cromatoplasmas modelo de los extractos etéreos de madera de *E. rudis*.

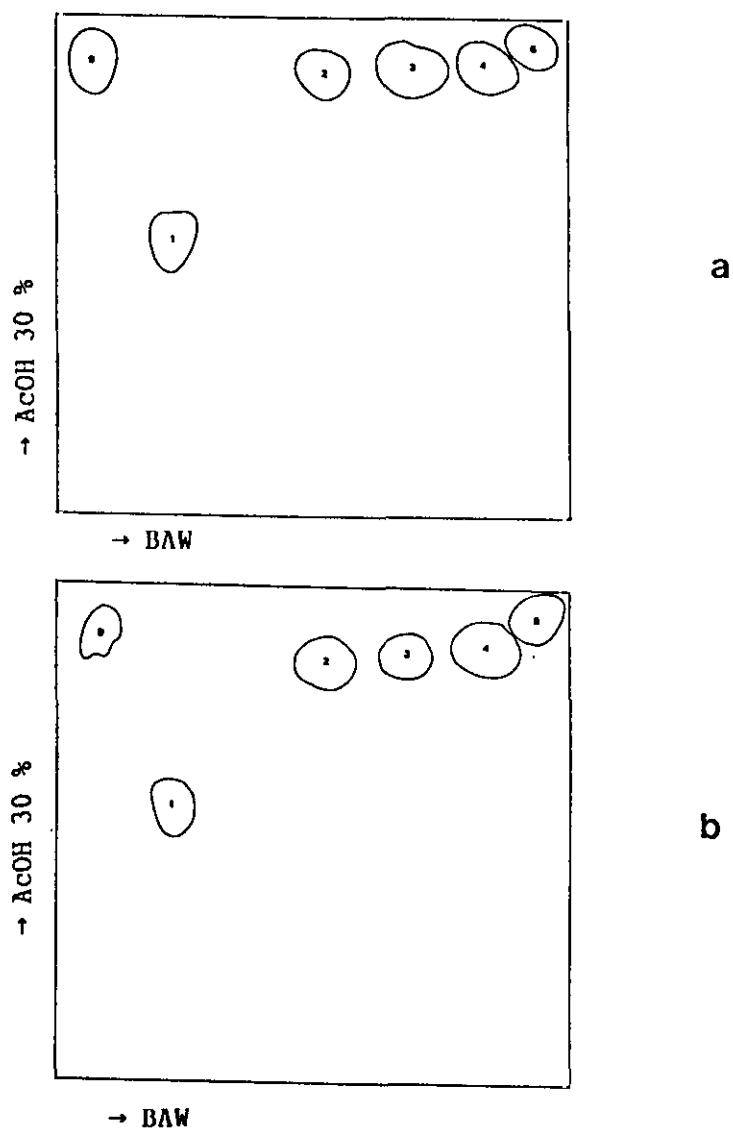


Figura X.3.2.: Cromatoplasmas de extractos etéreos de madera de *E. rudis*. a: HER1. b: PER3.

La tabla X.3.6 reúne los  $R_f$  y las coloraciones, bajo luz UV y tras el revelado con reactivo A de Neu, de las distintas manchas, así como su posible identificación.



Tabla X.3.6: Componentes detectados en las placas de CCF de los extractos etéreos de madera de *E. rudis*

Mancha Nº	Rf		Color UV	Revelado React.A+PEG	Posible identificación
	1ª Dim.	2ª Dim.			
1	0,49	0,16	Am-Az	Az	Ac. elágico
2	0,85	0,50	Az	Az	Elagitanino
3	0,86	0,67	Az	Az	Elagitanino
4	0,86	0,84	Am	Am	Ac. o Ald. fenólico
5	0,91	0,93	Ma-Mo	Ma-Mo	Vainillina
9	0,89	0,01	-	Ma	*

Am = amarillo, Az = azul, Ma = marrón, Mo = morado; \* = no identificado.

Se ha mantenido la misma numeración de las manchas que en los extractos de madera de *E. camaldulensis* y *E. globulus*.

La presencia o ausencia de cada componente en los extractos de las distintas muestras se recoge en la tabla X.3.7.

Tabla X.3.7: Distribución de los componentes detectados por CCF en los extractos etéreos de madera de *E. rudis*

Nº	Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	Ac. elágico	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Elagitanino	+	-	+	-	-	-	+	+	+
3	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Ac. o Ald. fenólico	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Vainillina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+

H = Huelva, P = Pontevedra, ER = *E. rudis*;

+ = presencia, - = ausencia; \* = no identificado.

Estas distribuciones son menos complejas que las de *E. globulus*, tanto por la variedad de componentes, como por las diferencias entre muestras. No se detecta ningún componente o grupo de componentes que actúe como elemento diferenciador entre muestras. El elagitanino 2 podría actuar de esta manera, pero dada la baja sensibilidad de la CCF, podría suceder que este compuesto se encuentre, en baja concentración, en las muestras donde no ha sido detectado.

### 3.3.2. Corteza

La figura X.3.3 contiene cromatoplasmas modelo de los extractos etéreos de corteza de *E. rudis*.

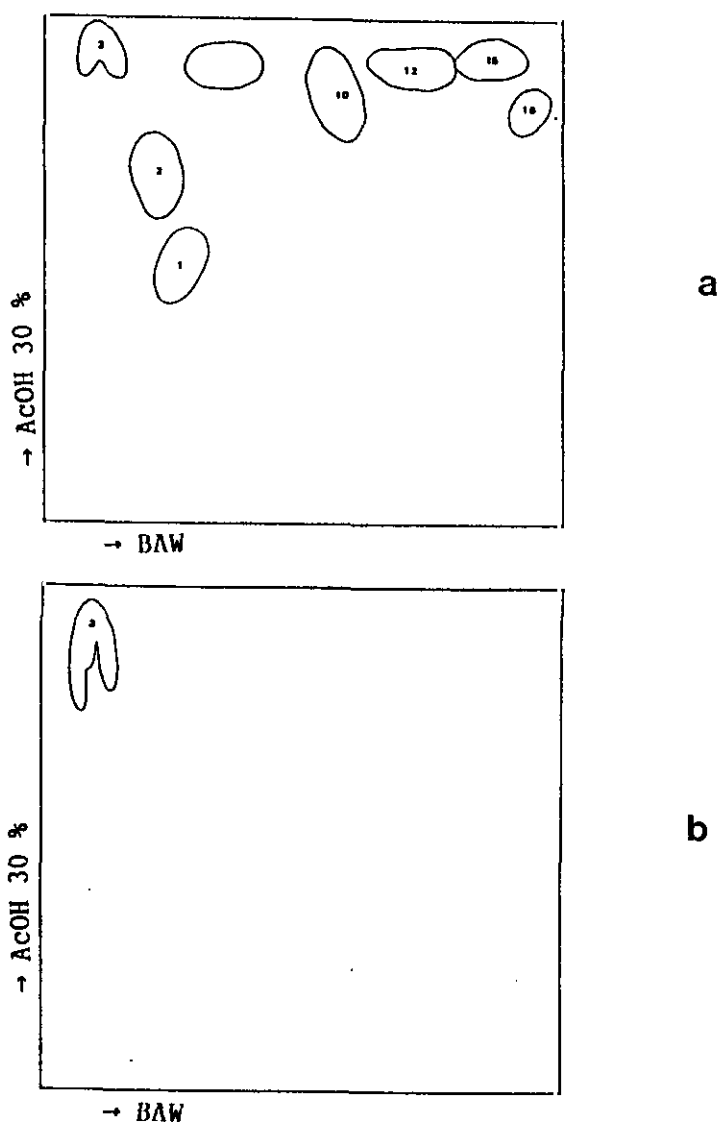


Figura X.3.3: Cromatoplasmas de extractos etéreos de corteza de *E. rudis*. a: HER3. b: PER3.

En la tabla X.3.8 se reúnen los  $R_f$  y las coloraciones, bajo luz UV y tras el revelado, como se ha expuesto anteriormente, de las distintas manchas, así como su posible identificación. Se ha mantenido la misma numeración que en *E. camaldulensis* y *E. globulus*.

Tabla X.3.8: Componentes detectados en las placas de CCF de los extractos etéreos de corteza de *E. rudis*

Mancha Nº	Rf		Color UV	Revelado React.A+PEG	Posible identificación
	1ª Dim.	2ª Dim.			
1	0,44	0,19	Am-Az	Az	Ac. elágico
2	0,66	0,14	Az	Az	Elagitanino
3	0,91	0,02	-	Am	*
10	0,85	0,52	Az	Az	Elagitanino
12	0,89	0,69	Az	Az	Elagitanino
15	0,90	0,86	Az	Mo	Ac. o Ald. fenólico
16	0,78	0,94	Az-Mo	Az-Mo	Ac. o Ald. fenólico

Am = amarillo, Az = azul, Ma = marrón, Mo = morado; \* = no identificado.

Comparados con los extractos de corteza de las especies anteriormente analizadas, los de *E. rudis* parecen más pobres, tanto en número, como en variedad de compuestos. No se ha reconocido ningún flavonoide en las placas.

Junto al ácido elágico, compuesto característico de las cortezas de *Eucalyptus*, se ha detectado la presencia de unos ácidos y aldehídos fenólicos, uno de los cuales podría ser el ácido protocatéquico (15).

Al igual que en las otras muestras de cortezas, se han identificado como elagitaninos una serie de manchas que presentaron coloraciones, en UV y tras el revelado, semejantes a las del ácido elágico. Como se ha comentado, no podemos asegurar la total fiabilidad de estas identificaciones.

En la tabla X.3.9 se indica la presencia o ausencia de cada componente en las distintas muestras.

Al comparar los extractos de corteza de Huelva y los de Pontevedra, destaca la extremada pobreza de estos últimos que sólo presentan el componente nº 3. La mancha de este componente en estas muestras parece mayor de lo habitual y aparenta estar formada por varios lóbulos superpuestos. Esto hace pensar que probablemente englobe a más de un compuesto.

Tabla X.3.9: Distribución de los componentes detectados por CCF en los extractos etéreos de corteza de <i>E. rudis</i>										
Nº	Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	Ac. elágico	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	Elagitanino	-	+	+	-	+	-	-	-	-
3	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	-	-	-
12	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	-	-	-
15	Ac. o Ald. fenólico	+	+	+	+	+	-	-	-	-
16	Ac. o Ald. fenólico	-	+	-	+	+	-	-	-	-

H = Huelva, P = Pontevedra, ER = *E. rudis*;  
 + = presencia, - = ausencia; \* = no identificado.

Estos resultados están en contradicción con los de rendimientos de extracción y contenido en fenoles totales de estos extractos, que parecían indicar una mayor riqueza en los extractos de Pontevedra. Sin embargo, está de acuerdo con las características de ambos tipos de cortezas. Los árboles de Pontevedra parecen presentar una deficiente aclimatación, ya que presentaban un desarrollo muy pobre y cortezas muy finas y oscuras.

### 3.3.3. Hojas

La figura X.3.4 contiene cromatoplasmas modelo de extractos etéreos de hojas de *E. rudis*.

La tabla X.3.10 reúne los valores de  $R_f$  y las coloraciones, bajo luz UV y tras el revelado habitual, de las distintas manchas, así como su posible identificación.

Las cromatoplasmas obtenidas se parecen más a las de *E. camaldulensis* que a las de *E. globulus*, presentando una mayor riqueza y variedad de flavonoles y una presencia mucho más escasa de elagitaninos. El flavonol 4 es un aglicón, mientras que los numerados con 6, 15 y 16 son glicósidos.

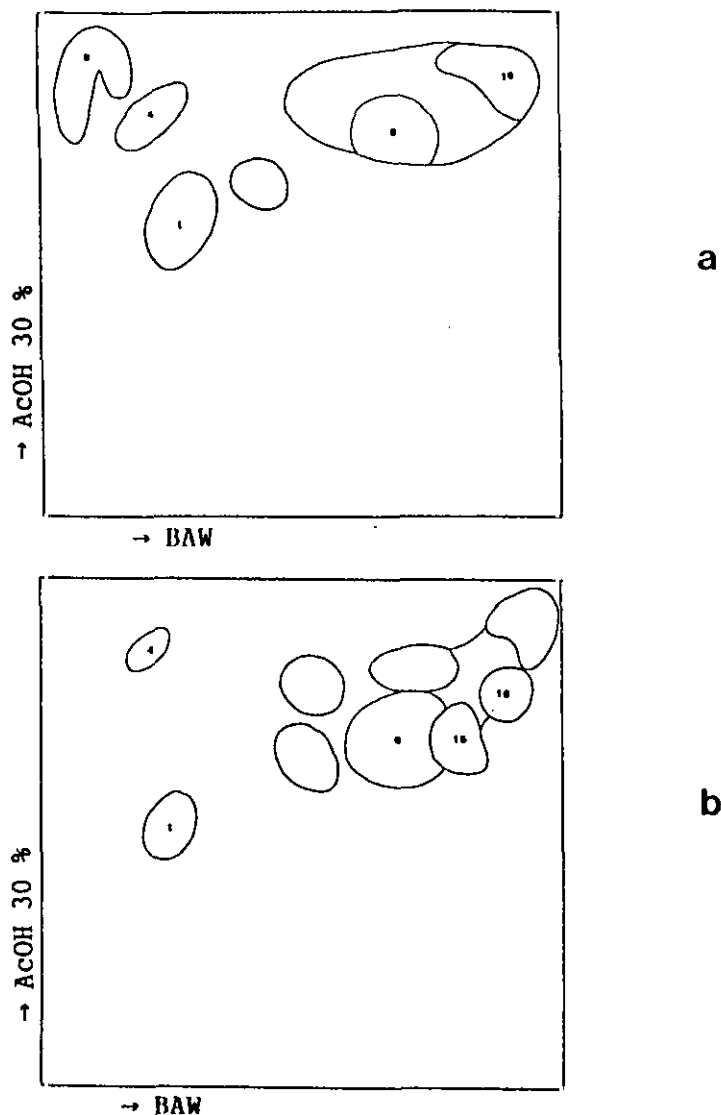


Figura X.3.4: Cromatoplasas de extractos etéreos de hojas de *E. rudis*. a: HER1. b: PER3.

Tabla X.3.10: Componentes detectados en las placas de CCF de los extractos etéreos de hojas de <i>E. rudis</i>					
Mancha Nº	Rf		Color UV	Revelado React.A+PEG	Posible identificación
	1ª Dim.	2ª Dim.			
1	0,45	0,19	Az	Az	Ac. elágico
4	0,74	0,13	-	Am	Flavonol
6	0,71	0,64	Am	Am-Na	Flavonol
9	0,88	0,01	Ma	Ma	*
15	0,65	0,77	Am	Am-Ve	Flavonol
16	0,70	0,87	Am	Am-Ve	Flavonol

Am = amarillo, Az = azul, Ma = marrón, Mo = morado, Na = naranja, Ve = verde;  
 \* = no identificado.

La tabla X.3.11 muestra la distribución de estos componentes en los extractos etéreos de hojas de *E. rudis*.

Tabla X.3.11: Distribución de los componentes detectados por CCF en los extractos etéreos de hojas de <i>E. rudis</i>										
Nº	Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	Ac. elágico	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Flavonol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Flavonol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	*	+	+	+	-	-	-	+	-	-
15	Flavonol	-	-	-	+	-	+	+	+	+
16	Flavonol	+	-	-	+	+	+	+	+	+

H = Huelva, P = Pontevedra, ER = *E. rudis*;  
 + = presencia, - = ausencia; \* = no identificado.

Se puede comentar que las muestras de Huelva presentan una menor riqueza en flavonoles que las de Pontevedra. La mancha 9, característica de *E. globulus*, aparece en algunas muestras de *E. rudis*, independientemente de su procedencia.

### 3.3.4. Conclusiones

1. Los extractos de madera de *E. rudis* son bastante más simples que los de *E. globulus* y *E. camaldulensis*, sin que existan diferencias notables entre las muestras de Huelva y las de Pontevedra.
2. Los extractos de corteza de *E. rudis* pueden clasificarse en dos bloques, según la procedencia de las muestras. Las de Huelva son mucho más ricas que las de Pontevedra, sin llegar a presentar la variedad y cantidad de componentes de las de *E. globulus* o *E. camaldulensis*. Las cromatoplasmas de extractos de corteza de *E. rudis* de Pontevedra sólo presentan la mancha 3, aunque aparentemente formada por más de un componente.
3. Los extractos de hojas de *E. rudis* muestran un comportamiento cromatográfico más semejante al de los de *E.*

*camaldulensis* que al de los de *E. globulus*, con la característica de una mayor riqueza en flavonoles y menor presencia de elagitaninos. Las muestras de Pontevedra parecen más ricas que las de Huelva.

### 3.4. ANALISIS POR CLAR. IDENTIFICACIONES. VALORACIONES SEMICUANTITATIVAS

#### 3.4.1. Maderas.

##### A) Identificaciones

La figura X.3.5 contiene cromatogramas modelo de extractos etéreos de madera de *E. rudis*.

Tanto en la figura como en las tablas siguientes, se ha mantenido el mismo criterio de numeración que en los apartados referentes a *E. camaldulensis* y *E. globulus*.

En los extractos etéreos de madera de *E. rudis*, se han identificado de forma directa, por CLAR:

- Acido gálico (1)
- Acido vainíllico (4)
- Aldehído siríngico (6)
- Vainillina (5)
- Acido elágico (11)

También se han reconocido elagitaninos por su espectro UV, pero, como ya se ha comentado anteriormente, no hemos considerado objeto de este estudio un análisis estructural profundo de estos compuestos.

Se ha reconocido también un flavonol, aunque no ha sido posible identificarlo.

En el apartado de *E. camaldulensis* se ha desarrollado la

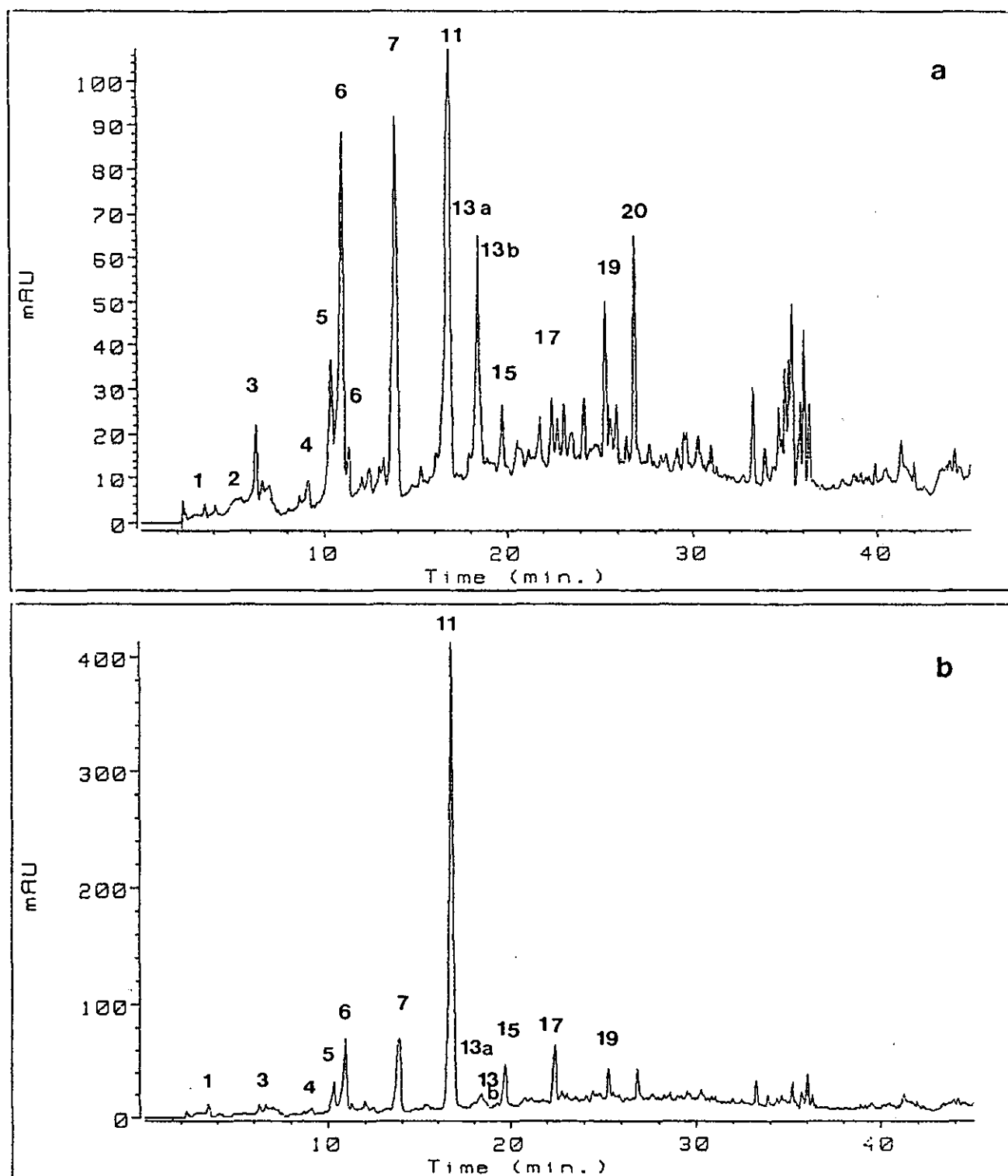


Figura X.3.5.: Cromatogramas de extractos etéreos de madera de *E. rudis*. a: HER3. PER2. (Absorbancia a  $325 \pm 75$  nm).



identificación del pico 7 como derivado del ácido o aldehído siríngico.

### B) Valoraciones semicuantitativas.

La tabla X.3.12 reúne los resultados de la valoración semicuantitativa de los componentes de los extractos etéreos de madera de *E. rudis*. En el Apéndice II, se recogen los valores de las áreas de los picos cromatográficos de dichos componentes, en unidades de integración.

Tabla X.3.12: Valoración semicuantitativa por CLAR de los componentes de los extractos eteréos de madera de <i>E. rudis</i>										
Pico	Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	Acido gálico	+	+	t	+	t	t	+	+	+
2	*	-	t	t	t	t	-	-	-	-
3	*	t	+	+	t	t	+	t	+	+
4	Ac. vainíllico	t	t	t	t	t	t	t	+	+
5	Vainillina	+	+	+	+	+	+	+	++	+
6	Ald. siríngico	+++	++	++	+	+	+	++	++	+
6a	*	+	+	+	t	t	-	-	-	-
7	Der. siríngico	+++	+++	++	++	+	+	++	+++	++
11	Acido elágico	+++	++	++	++	++	++	+++++	++++	+++++
13a	Elagitanino	+	+	+	+	+	t	+	+	-
13b	Flavonol	+	+	+	+	+	t	+	+	++
15	Elagitanino	+	-	+	-	-	-	+	-	+++
15a	*	-	+	-	+	+	+	-	++	-
17	Elagitanino	-	-	+	+	+	+	+	-	+++
19	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+	+	++
20	Flavanona	-	+	+	+	+	-	-	+	++

H = Huelva, P = Pontevedra; ER = *E. rudis*; t = trazas; \* = no identificado.

No parecen existir diferencias importantes en la composición de los extractos etéreos de las distintas muestras de madera de *E. rudis*:

- No se aprecian diferencias significativas en los contenidos de ácido gálico, ácido vainíllico, vainillina y aldehído siríngico entre las muestras de una procedencia y otra. Sí se observa es una mayor concentración de ácido elágico en las muestras de Pontevedra.

- Los elagitaninos no pueden considerarse como grupo diferenciador de las muestras por su procedencia. Solamente la muestra PER4 destaca sobre las demás, por presentar unas elevadas concentraciones de los elagitaninos 15, 17 y 19.

- Los extractos etéreos de madera de *E. rudis* se diferencian de los *E. camaldulensis* y *E. globulus* por su bajo contenido de flavanonas y de flavonoles.

#### 3.4.2. Corteza

La figura X.3.6 contiene cromatogramas modelo de extractos etéreos de corteza de *E. rudis*.

En la numeración de los picos cromatográficos se ha mantenido el mismo criterio que para *E. camaldulensis* y *E. globulus*.

Los componentes identificados directamente por CLAR son:

- Ácido gálico (1)
- Ácido protocatéquico (2)
- Aldehído protocatéquico (3a)
- Ácido vainílico (4)
- Vainillina (6)
- Ácido elágico (9)

También se han reconocido elagitaninos, por la semejanza de su espectro UV con el del ácido elágico, constituyente básico de su estructura.

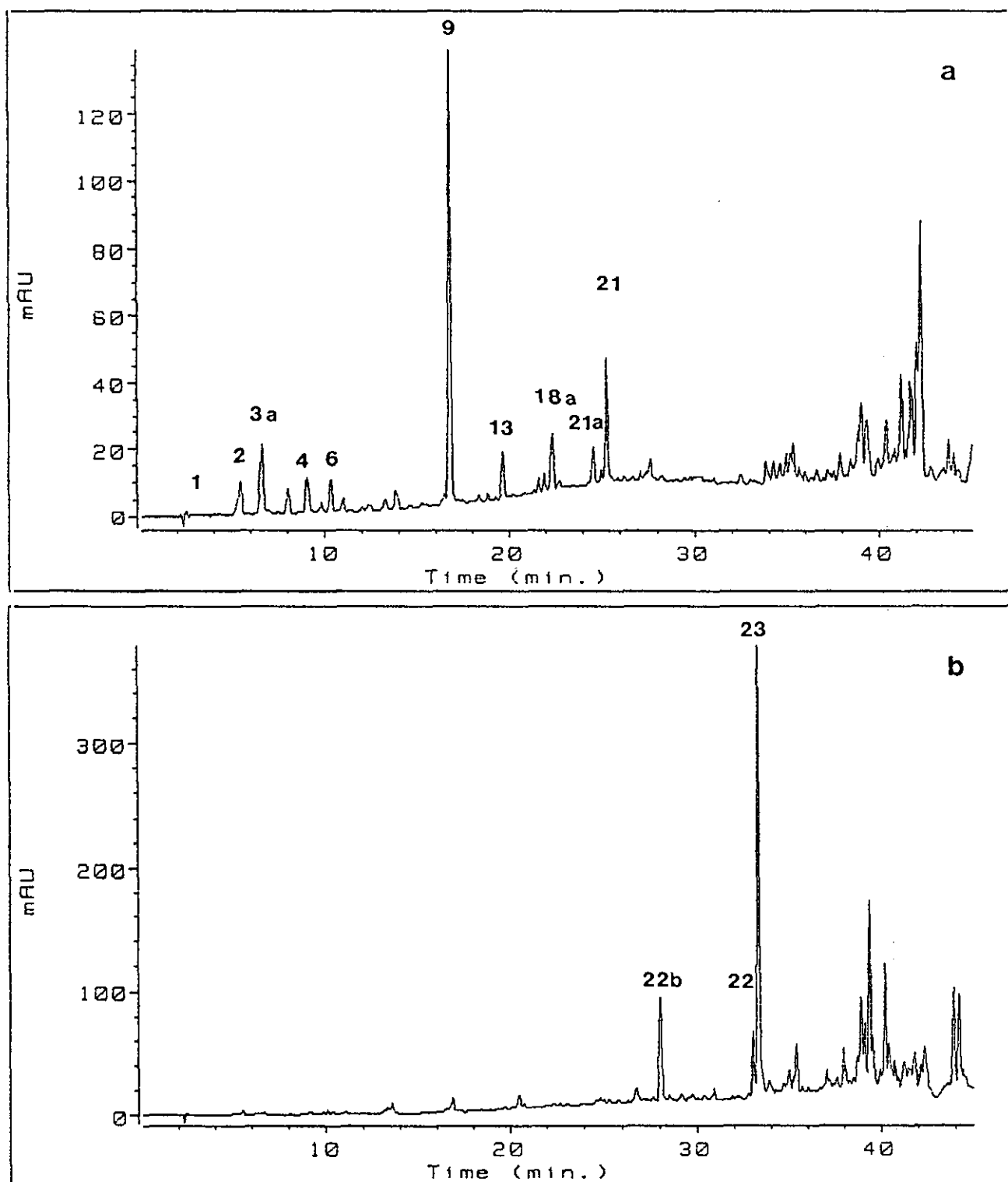


Figura X.3.6: Cromatogramas de extractos etéreos de corteza de *E. rudis*. a: HER3. b: PER2. (Absorbancia a  $325 \pm 75$  nm).

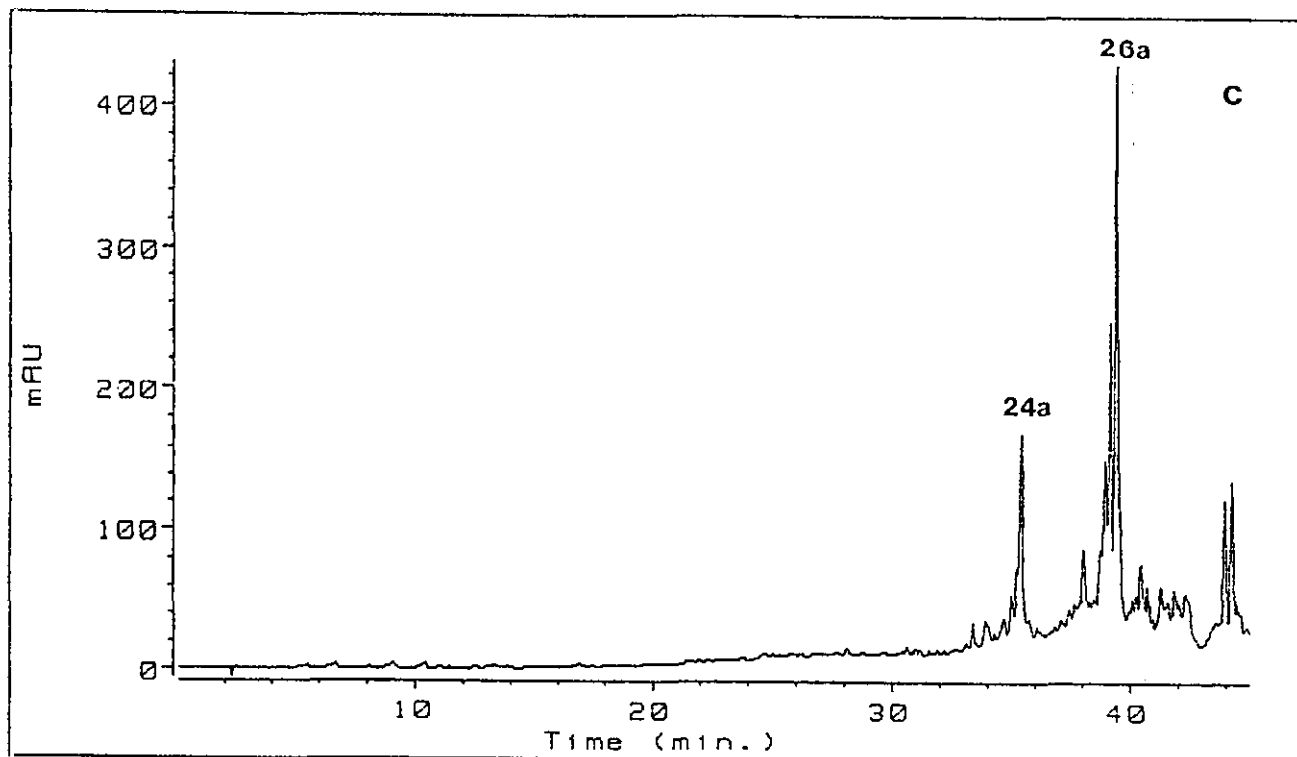


Figura X.3.6 (Cont.): Cromatogramas de extractos etéreos de corteza de *E. rudis*. c: PER3. (Absorbancia a  $325\pm 75$  nm).

\* Identificación de los picos 22b, 23, 24a y 26a.

Como se puede observar en los cromatogramas de los extractos de las cortezas de *E. rudis* de Pontevedra, éstos son completamente distintos de los estudiados hasta ahora, por su extremada pobreza en compuestos polifenólicos. De los picos 22b, 23, 24a y 26a, únicos presentes en los extractos de corteza de *E. rudis* de Pontevedra, el pico 23 fue detectado también en la corteza de la muestra PEC2 de *E. camaldulensis* (ver figura X.1.4.2).

La información inicial de que se disponía sobre la estructura de estos compuestos eran sus espectros UV y sus  $t_R$ :

- 22b y 23 presentan el mismo espectro UV y éste se asemeja al de un ácido benzoico (figura X.3.7A).
- 24a y 26a tienen ambos el mismo espectro UV, parecido al

de los ácidos cinámicos (figura X.3.7B).

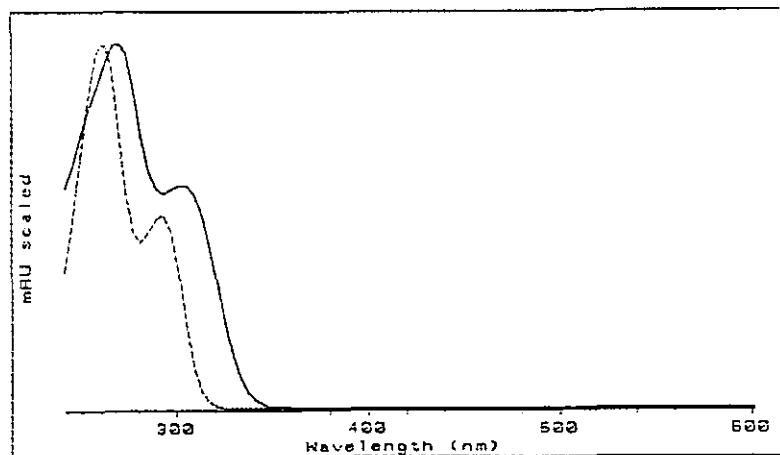
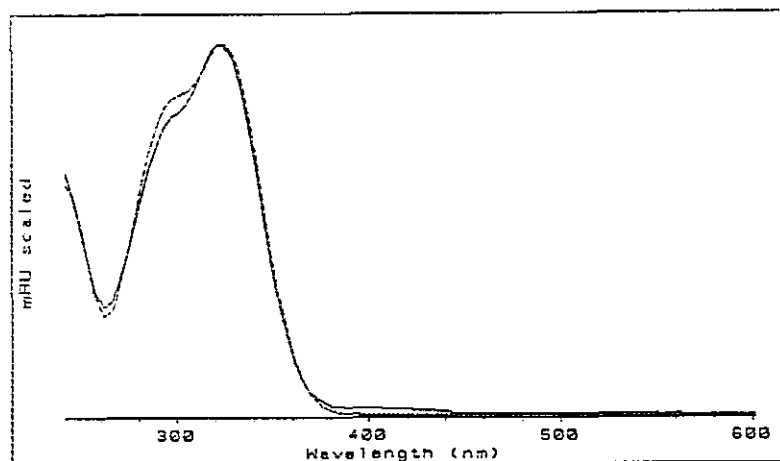


Figura X.3.7:

Espectro UV

A. — 22b o 23  
--- Ac. vainílico



B. — 24a o 26a  
--- Ac. cafeico

Sin embargo, los  $t_R$  de estos compuestos no corresponden a los de ácidos fenólicos, que aparecen en la primera parte del cromatograma.

Para avanzar en la elucidación estructural, se aislaron estos compuestos por CLAR semipreparativa y se estudiaron por CG-EM. Los espectros de masas obtenidos se compararon con la librería de espectros de patrones y el resultado fue el siguiente:

- 22b y 23 tienen un espectro muy semejante al del éster metílico del ácido 2,4-dihidroxi-6-metilbenzoico (figura X.3.8)

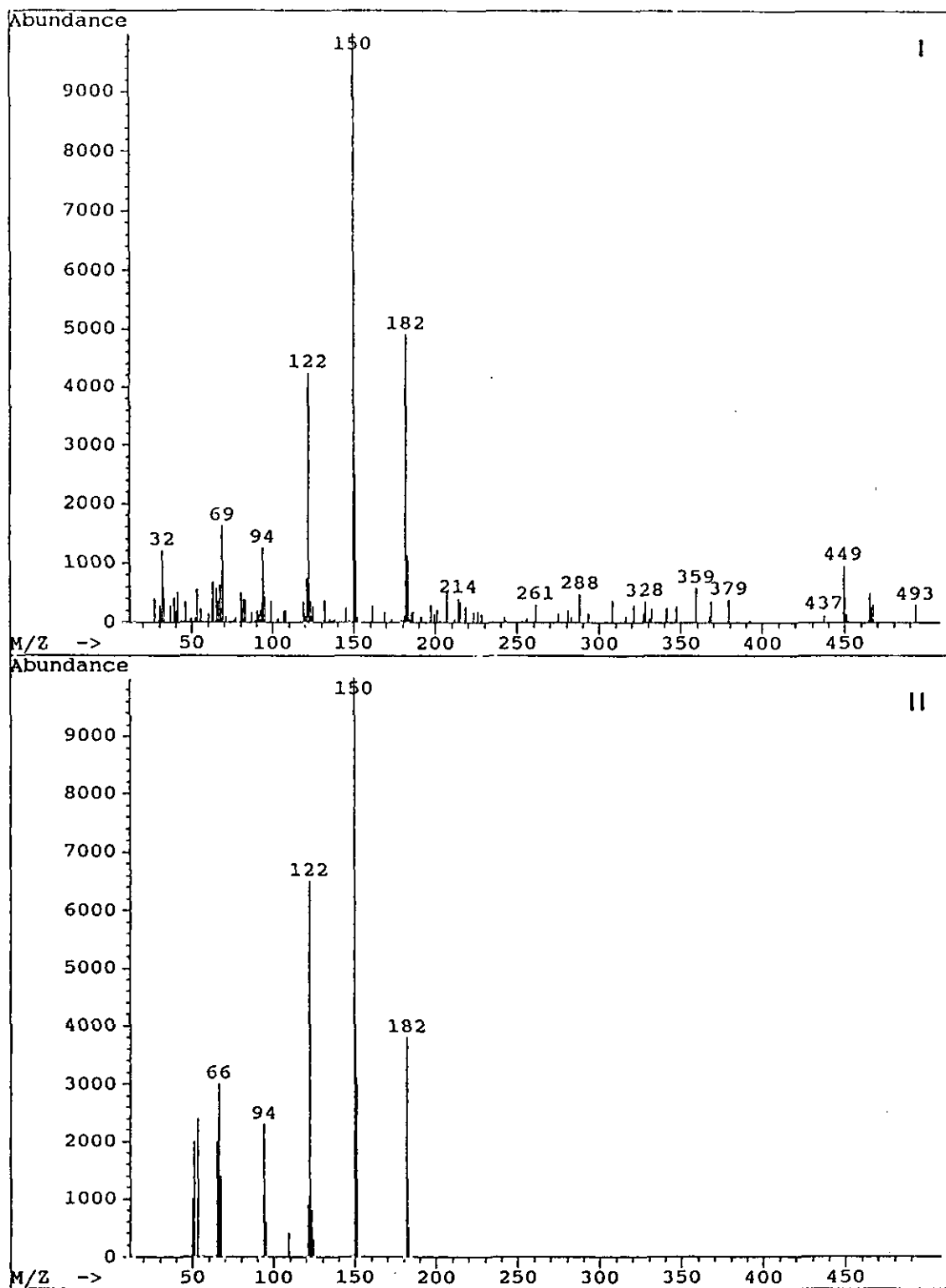


Figura X.3.8: Espectro de masas de los componentes de los picos 22b y 23 (I) y el del éster metílico del ácido 2,4-dihidroxi-6-metilbenzoico (II).

- El espectro de 24a y 26a presenta un alto grado de semejanza con el del éster metílico del ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenol)-2-propenoico (figura X.3.9.)

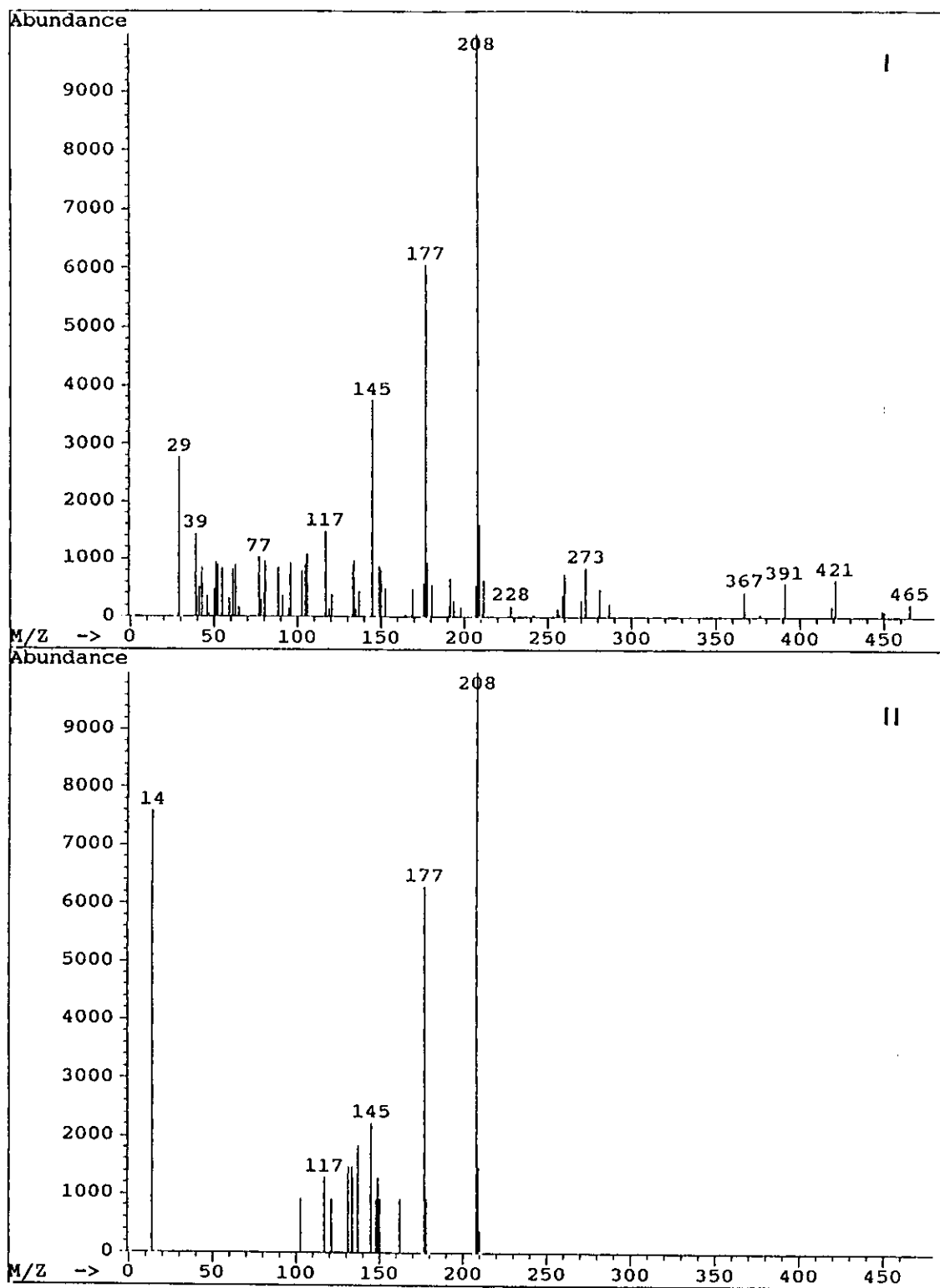


Figura X.3.9.: Espectro de masas de los componentes de los picos 24a y 26a (I) y el del éster metílico del ácido 3-(4-hidroxí-3-metoxifenol)-2-propenoico (II).

Por lo tanto, el retraso en el  $t_R$  se justifica porque el grupo ácido está bloqueado en forma de éster metílico. Se ha

descartado la posibilidad de que estos ésteres metílicos sean un artefacto de la extracción metanólica, ya que, en las mismas condiciones de extracción, hemos detectado sin dificultad ácidos fenólicos libres y no han aparecido sus ésteres.

El hecho de que cada pareja de compuestos tenga el mismo espectro de masas hace pensar que se trata de isómeros de posición.

### B) Valoraciones semicuantitativas

La tabla X.3.13 reúne los resultados de las valoraciones semicuantitativas de los componentes químicos de los extractos etéreos de corteza de *E. rudis*. Como en los casos anteriores, se puede recurrir al Apéndice II para obtener los valores de áreas de cada pico cromatográfico, en unidades de integrador.

Tabla X.3.13: Valoración semicuantitativa por CLAR de los componentes de los extractos etéreos de corteza de <i>E. rudis</i>										
Pico	Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	Ac. gálico	+	t	-	t	-	-	-	-	-
2	Ac. protocateq.	+	+	t	+	+	-	-	-	-
3a	Ald. protocateq.	+	++	+	++	+	-	-	-	-
4	Ac. vainílico	+	+	t	+	+	-	-	-	-
6	Vainillina	+	-	t	+	t	-	-	-	-
9	Ac. elágico	+++	++	+	+++	+	-	-	-	-
13	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	-	-	-
18a	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	-	-	-
21a	Elagitanino	-	+	+	-	+	-	-	-	-
21	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	-	-	-
22a	*	+	+	-	-	+	-	-	-	-
22b	Est. ac.benzóico	-	+	-	-	-	+	+	-	+
22c	*	-	+	-	-	-	-	-	-	-
22	*	-	-	-	-	-	+	+	-	+
23	Est. ac.benzóico	-	-	-	-	-	++	++	-	+++
24a	Est. ac.cinámico	-	-	-	-	-	-	-	++	-
26a	Est. ac.cinámico	-	-	-	-	-	-	-	+++	-

H = Huelva, P = Pontevedra; ER = *E. rudis*; t = trazas; \* = no identificado.

Como se ha comentado para *E. camaldulensis* y *E. globulus*, pueden compararse los resultados incluidos en tablas de extractos



de cortezas de distintas especies, pero no con los de madera o de hojas, dadas las distintas proporciones de materia prima y redisolución de extractos, empleados en cada caso.

De la observación de los cromatogramas y de la tabla X.3.13 se deduce que:

- No existe similitud entre los extractos de corteza de *E. rudis* de Huelva y de Pontevedra, debido a las especiales características de las cortezas de Pontevedra, consecuencia, probablemente, de la mala aclimatación de esta especie a las condiciones edafoclimáticas del NO peninsular. Los extractos de corteza de Pontevedra son muy pobres y sólo contienen los citados ésteres metílicos de ácidos benzóicos o cinámicos, dependiendo de las muestras.

- Los extractos de corteza de muestras de Huelva presentan una concentración media de ácidos y aldehídos fenólicos. A estos les acompañan diversos elagitaninos. Sin embargo, no se ha detectado en ellos la presencia de ningún flavonoide.

La comparación con las otras dos especies estudiadas permite concluir que los extractos de corteza de *E. rudis* de Huelva, aún siendo semejantes a los de las otras dos especies, se diferencian por ser más pobres en flavonoides. Las muestras de Pontevedra se podrían considerar un caso aparte, ya que sólo contienen los ésteres metílicos de los ácidos fenólicos ya mencionados.

### 3.4.3. Hojas

#### A) Identificaciones.

La figura X.3.10 contiene cromatogramas modelo de extractos etéreos de hojas de *E. rudis*.

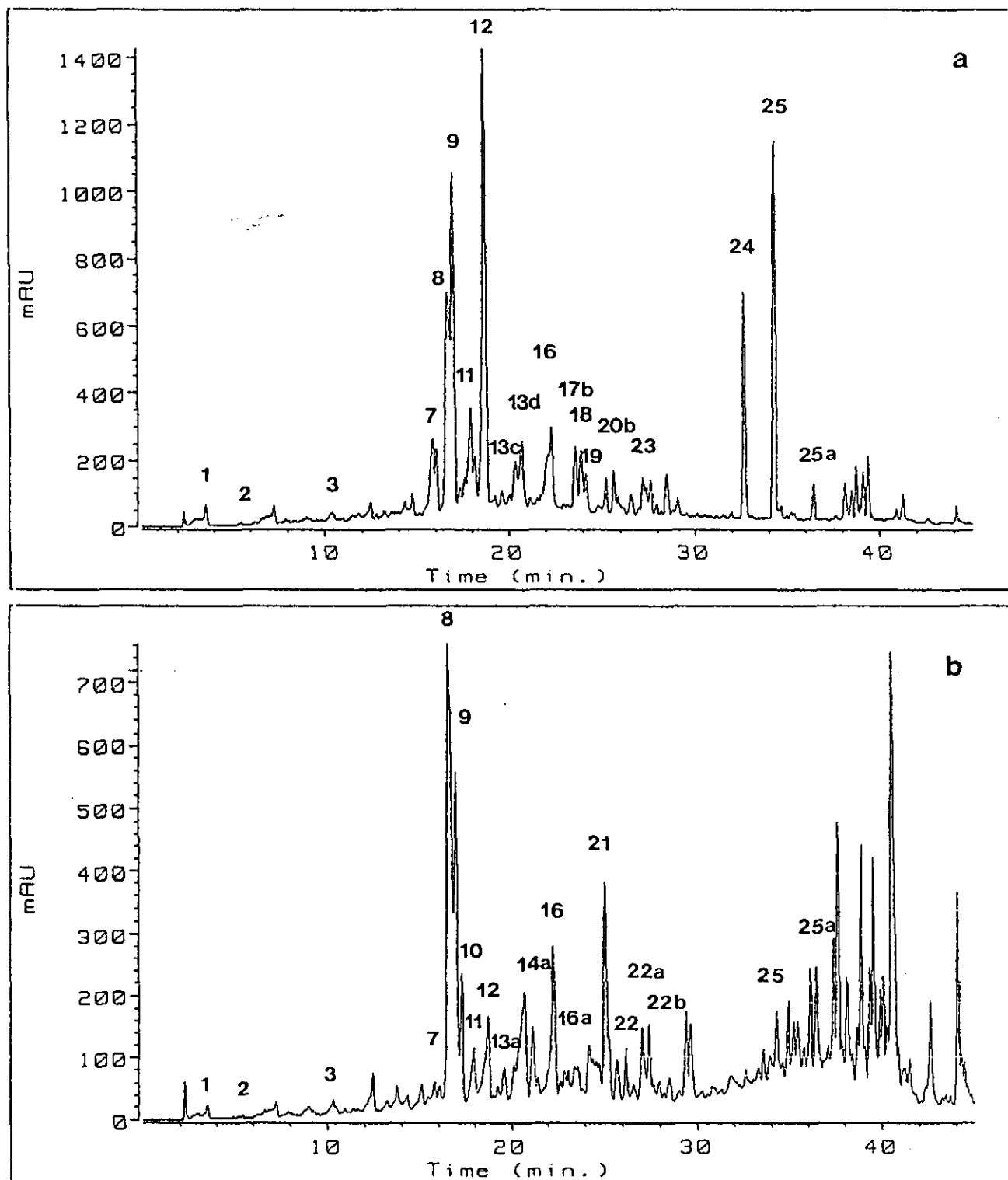


Figura X.3.10: Cromatogramas de extractos etéreos de hojas de *E. rudis*. a: HER4. b: PER2. (Absorbancia a  $325 \pm 75$  nm).

Se han seguido los mismos criterios de numeración que en los casos anteriores.

Los componentes identificados directamente por CLAR son:

- Acido gálico (1)
- Acido protocatéquico (2)
- Vainillina (3)
- Acido elágico (8)
- Quercetina (13d)
- Naringenina (14a)

También se ha detectado mediante su espectro UV, la presencia de elagitaninos, flavonoles y alguna flavanona, pero no ha sido posible su identificación. Como en *E. globulus*, se ha reconocido un componente (pico 22b), cuya estructura posiblemente corresponde a un derivado del kaempferol.

Los extractos de las muestras HER1, HER2, HER3 y PER2, y en menor proporción HER5, presentan un conjunto de picos en la parte final del cromatograma con un máximo de absorción a 280 nm y un hombro a 340 nm, al igual que ocurría en el caso de *E. globulus*.

#### B) Valoración semicuantitativa

La tabla X.3.14 reúne los resultados de las valoraciones semicuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de hojas de *E. rudis*. En el Apéndice II, se encuentran las áreas (en unidades de integrador) de los picos cromatográficos de estos extractos.

Como ya se ha comentado en *E. globulus* y *E. camaldulensis*, los resultados de estas tablas se pueden comparar con los de hojas de las otras especies, pero no con los de madera y corteza.

Tabla X.3.14: Valoración semicuantitativa por CLAR de los componentes de los extractos de hojas de *E. rudis*

Pico	Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	Ac. gálico	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Ac. protocatéq.	-	-	-	+	-	+	t	+	+
3	Vainillina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Rutina	-	+	+	++	+	+	+	+	+
8	Ac. elágico	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	++++
9	Quercetín-3-arabinósido	+++	+	-	++++	+++	++	++	+++	++++
10	Quercetín-3,7-diramnósido	+	+	+	-	-	+	+	++	++
11	Quercitrina	+	-	-	++	-	+	+	+	+
12	Kaempferol-3-arabinósido	+++	+	-	++++	++++	+++	++	++	++
13a	Elagitanino	+	+	+	+	+	+	+	-	-
13b	*	-	+	++	-	+	+	+	+	+
13c	*	-	-	-	+	-	+	++	+	++
13d	Quercetina	++	+	++	++	++	-	-	-	-
13	*	-	-	-	-	-	+	-	+	+
14a	Naringenina	+	+	+	-	-	-	+	-	-
14b	Flavanona	++	+	+	-	-	-	-	-	-
16	Flavonol	++	++	+	+	+++	++	++	+++	++
16a	Flavanona	-	-	-	-	-	-	+	-	-
17b	Flavonol	-	-	+	+	++	+	-	+	-
18	*	+	+	-	+	-	+	-	++	+
19	*	+	+	-	+	+	-	-	+	+
20a	*	+	+	+	+	+	-	-	-	-
20b	Elagitanino	+	+	+	+	+	-	-	-	-
21	*	+	+	+	-	+	++	+++	+++	++
22	*	-	+	+	-	-	++	+	++	++
22a	Flavanona	-	+	-	-	-	-	+	-	-
22b	Der. kaempferol	+	+	++	-	+	-	+	-	-
23	*	t	t	+	t	+	+	+	+	+
24	Sesquiterpeno(?)	++	+	++	++	+++	+	-	+	+
25	Sesquiterpeno(?)	+++	+++	++++	+++	++++	+	+	+	+
25a	Sesquiterpeno(?)	++	+	-	+	-	+	++	-	-
26	Sesquiterpeno(?)	+	+	-	-	-	+	-	-	-

Huelva, P = Pontevedra; ER = *E. rudis*; t = trazas; \* = no identificado

No se observan grandes diferencias en la composición de los extractos de hojas de *E. rudis* de distintas procedencias. Se podría destacar que las muestras de Huelva presentan menores contenidos en glicósidos de quercetina y kaempferol que las de Pontevedra. Sin embargo, en las de Pontevedra no se ha detectado la presencia de quercetina.

Los extractos de hojas de *E. rudis* presentan características análogas a los de *E. camaldulensis*, como son la mayor variedad y concentración de flavonoles y los bajos contenidos en elagitaninos. Sin embargo, los cromatogramas de algunas muestras presentan compuestos de alto  $t_R$  semejantes a los de *E. globulus*.

#### 3.4.4. Conclusiones

1. Con la excepción de las hojas, las muestras de *E. rudis* presentan patrones de composición química más sencillos que *E. globulus* y *E. camaldulensis*. Las maderas, con diversidad de ácidos y aldehídos fenólicos, carecen prácticamente de flavonoides. Las cortezas de Pontevedra contienen solamente ésteres de ácidos fenólicos, y las de Huelva, al igual que sucedía con las maderas, están compuestas, fundamentalmente, por ácidos y aldehídos fenólicos, con pequeñas concentraciones de elagitaninos.

2. La composición de las hojas se aproxima más a la de *E. camaldulensis* que al *E. globulus*, por la variedad de glicósidos flavonoídicos presentes.

3. No se aprecian grandes diferencias en la composición de los extractos de los distintos tejidos según su procedencia, excepto en el caso de las cortezas de Pontevedra.

#### 3.5. VALORACIONES CUANTITATIVAS

En este apartado se reúnen los resultados de la cuantificación por el método del patrón externo de los componentes de los extractos de madera, corteza y hojas de *E. rudis*. Las rectas de calibración se elaboraron con patrones comerciales de los compuestos correspondientes.

Tabla X.3.15: Valoraciones cuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de madera de *E. rudis*

Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
Acido gálico									
μg/ml	t	1,3	t	t	t	t	t	25,0	18,3
μg/g mat. seca	t	0,3	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	7,0	5,4
Vainillina									
μg/ml	22,6	18,8	14,2	3,5	t	t	8,8	47,4	11,5
μg/g mat. seca	6,2	5,2	3,9	1,0	Nc	Nc	2,5	13,4	3,4
Acido elágico									
μg/ml	91,4	75,8	82,3	76,9	51,7	53,2	222,8	137,5	506,5
μg/g mat. seca	25,1	21,0	22,6	21,3	14,5	16,6	63,2	39,0	150,0

t = trazas, Nc = No cuantificable

Tabla X.3.16: Valoraciones cuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de corteza de *E. rudis*

Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
Acido gálico									
μg/ml	9,4	t	0	6,6	0	0	0	0	0
μg/g mat. seca	6,7	Nc	0	4,9	0	0	0	0	0
Ac. protocatéq.									
μg/ml	45,4	86,5	t	112,9	16,0	0	0	0	0
μg/g mat. seca	32,6	61,3	Nc	83,6	10,9	0	0	0	0
Ald. protocaté.									
μg/ml	37,2	63,4	12,5	82,8	51,7	0	0	0	0
μg/g mat. seca	26,7	44,2	9,5	61,3	35,3	0	0	0	0
Vainillina									
μg/ml	5,3	0	t	2,8	t	0	0	0	0
μg/g mat. seca	3,8	0	Nc	2,0	Nc	0	0	0	0
Acido elágico									
μg/ml	164,1	83,3	48,3	190,0	30,0	0	0	0	0
μg/g mat. seca	117,6	59,1	36,5	140,8	20,4	0	0	0	0

t = trazas, Nc = No cuantificable

Tabla X.3.17: Valoraciones cuantitativas de los componentes de los extractos etéreos de hojas de *E. rudis*

Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
Acido gálico									
μg/ml	38,6	1,6	t	135,3	39,4	56,0	28,8	87,5	87,0
μg/g mat. seca	10,5	0,4	Nc	36,8	11,0	19,7	10,2	30,7	30,5
Ac. protocatéq.									
μg/ml	0	0	0	15,0	0	8,2	t	1,8	22,4
μg/g mat. seca	0	0	0	4,0	0	2,9	Nc	0,6	7,9
Vainillina									
μg/ml	27,3	27,2	16,8	49,9	38,6	19,4	24,9	35,3	50,1
μg/g mat. seca	7,4	7,5	4,9	13,6	10,8	6,8	8,8	12,4	17,6
Acido elágico									
μg/ml	518,1	297,9	274,9	393,1	513,8	421,2	443,6	301,7	323,7
μg/g mat. seca	141,0	82,7	79,7	107,0	144,2	147,8	157,3	105,8	113,6
Quercitrina									
μg/ml	145,5	0	0	253,9	0	113,7	96,7	105,5	133,6
μg/g mat. seca	39,6	0	0	69,1	0	39,9	34,3	37,0	46,9
Quercetina									
μg/ml	223,2	71,0	143,9	165,1	158,1	0	0	0	0
μg/g mat. seca	60,7	19,7	41,7	44,9	44,4	0	0	0	0
Naringenina									
μg/ml	302,3	155,7	114,8	0	0	0	148,9	0	0
μg/g mat. seca	82,2	43,2	33,3	0	0	0	52,8	0	0

t = trazas, Nc = No cuantificable

## 4. RESULTADOS DE LOS ANALISIS NUMERICOS

### 4.1. ANALISIS UNIVARIANTE

Las tablas X.4.1, X.4.2 y X.4.3 recogen los resultados de los análisis univariantes relativos a los rendimientos y composición química de los extractos de madera, corteza y hojas de las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas. En ellas se incluyen las medias y coeficientes de variación, para las variables continuas, y las abundancias relativas para las discretas, así como las diferencias y los agrupamientos entre especies respecto a cada variable.

Las variables se han situado dentro de las tablas, siempre que ha sido posible, manteniendo la distribución que se utilizará para los análisis multivariantes. Las razones de los agrupamientos de variables fueron explicados en el apartado IX.



# Madera

Tabla X.4.1: Análisis univariante de extractos de madera

	<i>E. camald.</i>		<i>E. globulus</i>		<i>E. rudis</i>		
	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	Dif/Agru.
Rdto.ext.metanólico	6,07	50	3,67	22	4,40	22	** C-G-R
Rdto.ext.etéreo	0,28	32	0,30	20	0,29	24	No -CGR-
Fenoles totales	13,87	55	11,45	40	11,48	29	No -CGR-
Ext. Alcohol-Benceno	3,64	47	1,70	19	2,39	21	*** C--GR.
Cenizas	0,70	44	1,02	43	0,71	41	No -CGR-
Solub. agua fría	5,91	61	3,67	19	5,08	32	* CR--G
Solub. agua caliente	6,93	51	4,27	20	5,40	24	* C--GR
Solub. sosa	17,27	21	16,49	13	17,57	11	No -CGR-
Holocelulosa	79,57	3	83,98	1	82,98	1	*** C--GR
Ligninas	23,71	10	21,73	7	23,53	8	* CR--G
Pentosanos	18,10	8	23,16	7	19,35	6	*** CR--G
1. Acido gálico	183,8	27	526,2	53	275,1	60	*** CR--G
4. Acido vainílico	Escaso		Escaso		Moderado		Sí CG--R
5. Vainillina	571,6	48	893,4	41	653,1	44	No -CGR-
6. Ald. siríngico	1120,8	69	2826,1	72	1420,5	60	** CR--G
7. Der. siríngico	Moderado		Moderado		Moderado		Sí CR--G
11. Acido elágico	2364,5	65	5052,2	30	4391,0	99	No -CGR-
13a. Elagitanino	Ausente		Moderado		Escaso		Sí C-G-R
14. Elagitanino	Moderado		Escaso		Ausente		Sí C--GR
15. Elagitanino	Escaso		Abundante		Escaso		Sí CR--G
16b. Elagitanino	Ausente		Escaso		Ausente		Sí CR--G
17. Elagitanino	Moderado		Escaso		Escaso		No -CGR-
19. Elagitanino	Moderado		Moderado		Moderado		No -CGR-
13b. Flavonol	Ausente		Moderado		Moderado		Sí C--GR
16a. Quercetina	Ausente		Escaso		Ausente		No -CGR-
17a. Flavonol	Ausente		Escaso		Ausente		No -CGR-
8. Flavanona	Escaso		Ausente		Ausente		Sí C--GR
12. Flavanona	Escaso		Ausente		Ausente		Sí C--GR
16. Naringenina	Escaso		Escaso		Ausente		No -CGR-
18. Flavanona	Escaso		Ausente		Ausente		No -CGR-
20. Flavanona	Escaso		Ausente		Moderado		Sí CG--R
2. No identificado	Moderado		Escaso		Escaso		Sí C--GR
3. No identificado	1096,4	90	525,4	59	298,9	87	** C-G-R
6a. No identificado	Ausente		Escaso		Escaso		Sí C--GR
9. No identificado	Escaso		Ausente		Ausente		Sí C--GR
10. No identificado	Moderado		Ausente		Ausente		Sí C--GR
13. No identificado	Escaso		Ausente		Ausente		Sí C--GR
15a. No identificado	Ausente		Ausente		Escaso		Sí CG--R

Dif/Agrup. = Diferencias significativas/Agrupamientos entre especies por semejanza. \* = 10 %; \*\* = 5 %; \*\*\* = 10 %.  $\bar{x}$  = Media. CV = Coeficiente de variación. C = *E. camaldulensis*. G = *E. globulus*. R = *E. rudis*.

De los resultados del análisis univariante de maderas se deduce:

1. De las variables relativas a los rendimientos de extracción y al contenido de fenoles totales, sólo el rendimiento de extracto metanólico manifiesta diferencias significativas entre las tres especies. La extracción en alcohol-benceno muestra un comportamiento similar. Este comportamiento puede explicarse por las características parecidas de ambos disolventes, si bien la mezcla MeOH-H<sub>2</sub>O presenta mayor polaridad que la EtOH-benceno.

2. Los análisis normalizados de madera proporcionan unos resultados parcialmente diferentes a lo esperado. Partiendo del supuesto de que, de las tres especies estudiadas, la madera más apropiada para la producción de pasta es la de *E. globulus*, siguiendo en orden decreciente la de *E. camaldulensis* y la de *E. rudis* (BUSTAMANTE EZPELETA Y SANTOS VIQUEIRA, 1983), los agrupamientos más esperados respecto a estas variables serían CR--G, CG--R. Se observa que, para los extractos en alcohol-benceno, las solubilidades en agua caliente y el contenido en holocelulosa, *E. globulus* sigue mostrando los resultados más favorables. Pero las tres especies manifiestan menores diferencias de las esperadas, y éstas han originado el agrupamiento C--GR. Respecto a las tres variables fundamentales para la calidad de la madera como productora de pasta, a saber, holocelulosa, ligninas y pentosanos, se observa que *E. rudis*, comparada con *E. camaldulensis*, presenta mayores contenidos de holocelulosa y menores de ligninas, lo que determinaría una mayor calidad, y, sin embargo, mayores contenidos de pentosanos, lo que justificaría peor calidad a pesar de los buenos resultados de los datos anteriores. Por lo tanto, estos resultados apoyan el criterio de los productores de papel, según el cual, de las maderas analizadas, las de *E. globulus* son las de mayor calidad para producir pasta de papel. Por contra, las de *E. rudis* y *E. camaldulensis* manifiestan menos

diferencias de las esperadas teóricamente entre ellas mismas, y con el *E. globulus*.

3. Del análisis cromatográfico de los componentes químicos de los extractos etéreos de madera, se observa que:

- Del grupo de los ácidos y aldehídos fenólicos, se pueden establecer relaciones entre los contenidos de ácido gálico y ácido elágico, como precursores de los taninos hidrolizables. El ácido elágico es el componente mayoritario en la mayor parte de los extractos de madera, y dentro de las tres especies, se encuentra en mayor cantidad en *E. globulus*, aunque de forma no significativa. La presencia de ácido gálico se ordena de forma similar al ácido elágico, aunque en este caso separa al *E. globulus* de las otras especies de forma estadísticamente significativa. El aldehído siríngico y el derivado siríngico (pico 7), y la vainillina, se comportan de forma paralela a los ácidos gálico y elágico, respectivamente. El ácido vainílico establece agrupamientos diferentes del resto.

- Entre los componentes más abundantes dentro de los extractos de madera se encuentran algunos elagitaninos, con distinta estructura dependiendo de la especie. No se observan diferencias en la concentración del elagitanino 19, que parece ser el más frecuente en las tres especies.

- En cuanto a los flavonoides, se pueden considerar que son componentes minoritarios dentro de los extractos de madera. Los agrupamientos más frecuentes son los C--GR, o -CGR-, es decir, la ausencia de diferencias significativas entre las especies, que se repiten tanto para flavonoles como para flavanonas, debido a que *E. camaldulensis* es más rico en flavanonas y, sin embargo, *E. globulus* y *E. rudis* lo son en flavonoles.

# Corteza

Tabla X.4.2: Análisis univariante de extractos de corteza

	<i>E. camald.</i>	<i>E. globulus</i>	<i>E. rudis</i>	
	$\bar{x}$ CV	$\bar{x}$ CV	$\bar{x}$ CV	Dif/Agru.
Rdto.ext.metanólico	13,57 93	6,23 51	6,59 97	No -CGR-
Rdto.ext.etéreo	0,85 19	1,06 20	1,64 74	* CG--R
Fenoles totales	66,16 105	18,05 64	4,66 55	*** C--GR
1. Acido gálico	Moderado	Moderado	Escaso	Sí CG--R
2. Ac.protocatéuico	Moderado	Escaso	Escaso	No -CGR-
3a. Ald. protocaté.	Moderado	Escaso	Escaso	No -CGR-
4. Acido vainíllico	Escaso	Escaso	Escaso	No -CGR-
5. Acido siringico	Escaso	Ausente	Ausente	No -CGR-
6. Vainillina	Escaso	Ausente	Escaso	Sí C-G-R
9. Acido elágico	Moderado	Abundante	Escaso	Sí CG--R
12. Elagitanino	Escaso	Escaso	Ausente	No -CGR-
13. Elagitanino	Escaso	Abundante	Escaso	Sí CR--G
14a. Elagitanino	Ausente	Escaso	Ausente	Sí CR--G
18a. Elagitanino	Ausente	Moderado	Escaso	Sí C-G-R
21a. Elagitanino	Ausente	Escaso	Escaso	No -CGR-
21. Elagitanino	Escaso	Moderado	Escaso	No -CGR-
10. Quercitrina	Escaso	Ausente	Ausente	Sí C--GR
14. Quercetina	Moderado	Escaso	Ausente	Sí CG--R
18. Flavonol	Escaso	Moderado	Ausente	Sí C-G-R
19. Kaempferol	Escaso	Ausente	Ausente	No -CGR-
7. Flavanona	Escaso	Ausente	Ausente	Sí C--GR
8. Naringina	Escaso	Ausente	Ausente	No -CGR-
11. Eriodictyol	Escaso	Moderado	Ausente	Sí C-G-R
15. Naringenina	Escaso	Escaso	Ausente	Sí C-G-R
16. Flavanona	Moderado	Ausente	Ausente	Sí C--GR
20. Flavanona	Escaso	Ausente	Ausente	Sí C--GR
3. No identificado	Moderado	Escaso	Ausente	Sí C--GR
7a. Taxifolina	Ausente	Moderado	Ausente	Sí CR--G
17. Luteolina	Escaso	Ausente	Ausente	Sí C--GR
20a. Apigenina	Ausente	Escaso	Ausente	No -CGR-
22a. No identificado	Ausente	Ausente	Escaso	Sí CG--R
22b. Ester ác.benzo.	Ausente	Ausente	Escaso	Sí CG--R
22c. No identificado	Ausente	Ausente	Escaso	No -CGR-
22. No identificado	Escaso	Ausente	Escaso	No -CGR-
23. Ester ác.benzo.	Escaso	Ausente	Escaso	No -CGR-
24. No identificado	Escaso	Ausente	Ausente	No -CGR-
24a. Ester ác.cinám.	Ausente	Ausente	Escaso	No -CGR-
25. No identificado	Escaso	Ausente	Ausente	No -CGR-
26. No identificado	Escaso	Ausente	Ausente	No -CGR-
26a. Ester ác.cinám.	Ausente	Ausente	Escaso	No -CGR-

Dif/Agrup. = Diferencias significativas/Agrupamientos entre especies por semejanza. \* = 10 %; \*\* = 5 %; \*\*\* = 1 %.  $\bar{x}$  = Media. CV = Coeficiente de variación. C = *E. camaldulensis*. G = *E. globulus*. R = *E. rudis*.

Sobre los resultados de los análisis de los extractos de corteza se pueden hacer las siguientes consideraciones:

1. Respecto a las variables relacionadas con los rendimientos de extracción y con los contenidos de fenoles totales, se observa un comportamiento diferente al que mostraban los extractos de madera. Las dos características más destacadas son los elevadísimos coeficientes de variación del rendimiento del extracto metanólico y del contenido en fenoles totales de las cortezas de *E. camaldulensis*, así como el bajo contenido en fenoles totales de las muestras de *E. rudis*.

2. El grupo de ácidos y aldehídos fenólicos es más extenso en cuanto a variedad y cantidad en cortezas de *E. camaldulensis* y *E. globulus* que en las maderas de las mismas especies. Se puede observar que la parejas ácido gálico/ácido elágico y ácido vainíllico/ácido siríngico, originan agrupamientos iguales dentro de cada pareja, aunque distintos entre ellas. La vainillina y el aldehído protocatéquico, los aldehídos fenólicos del grupo, presentan un comportamiento diferente.

3. El grupo de elagitaninos genera una gran variedad de agrupamientos, siendo característicos los compuestos 13 y 18a, que manifiestan una relevancia especial en *E. globulus*.

4. Dentro del grupo de flavonoides se han reconocido flavonoles, flavanonas, un dihidroflavonol (taxifolina) y dos flavonas (luteolina y apigenina). Todos ellos carecen de relevancia dentro de *E. rudis*, y producen diversidad de agrupamientos en función de las concentraciones relativas de *E. globulus* y *E. camaldulensis*. Se podrían considerar asociaciones internas: de quercetina y sus derivados; quercitrina (glicósido) y taxifolina (dihidroquercetina); de naringenina y su derivada naringina. No existe una relación de semejanza entre las asociaciones de estos compuestos.

5. El grupo de compuestos considerados independientemente, por su escasa presencia y su comportamiento y agrupamientos poco definidos, no nos permiten ni concluir nada sobre ellos ni utilizarlos como elementos diferenciadores.

## Hojas

Tabla X.4.3: Análisis univariante de extractos de hojas							
	<i>E. camald.</i>		<i>E. globulus</i>		<i>E. rudis</i>		
	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	Dif/Agru.
Rdto.ext.metanólico	33,04	20	25,18	17	27,49	16	** C--GR
Rdto.ext.etéreo	1,63	52	0,77	22	1,45	52	** CR--G
Fenoles totales	71,73	31	54,09	22	61,24	13	No -CGR-
1. Acido gálico	2048,6	31	1537,9	24	950,0	60	*** C-G-R
2.Ac.protocatéquico	Abundante		Escaso		Escaso		Sí 'C-G-R
3. Vainillina	Escaso		Escaso		Abundante		Sí CG--R
8. Acido elágico	9877,4	19	13636,4	11	12996,5	24	** C-G-R
4. Elagitanino	Escaso		Ausente		Ausente		Sí C--GR
11a. Elagitanino	Ausente		Abundante		Escaso		Sí CR--G
13a. Elagitanino	Ausente		Abundante		Escaso		Sí CR--G
15a. Elagitanino	Ausente		Escaso		Ausente		No -CGR-
20b. Elagitanino	Ausente		Escaso		Moderado		Sí C--GR
5. Flavonol	Escaso		Ausente		Ausente		No -CGR-
6. Flavonol	Escaso		Ausente		Ausente		No -CGR-
7. Rutina	Abundante		Ausente		Abundante		Sí CR--G
9.Quercetín-3-arab.	Abundante		Ausente		Abundante		Sí CR--G
10.Quercetín-diram.	Moderado		Ausente		Moderado		Sí CR--G
11. Quercitrina	Escaso		Abundante		Escaso		Sí CR--G
12.Kaempfer-3-arab.	Moderado		Ausente		Moderado		Sí CR--G
13d. Quercetina	Ausente		Ausente		Moderado		Sí CG--R
16. Flavonol	Escaso		Ausente		Moderado		Sí C-G-R
17. Kaempferol	Escaso		Ausente		Ausente		No -CGR-
17b. Flavonol	Ausente		Ausente		Escaso		Sí CG--R
20. Flavonol	Escaso		Ausente		Ausente		Sí 'C--GR
22b.Der. kaempferol	Ausente		Escaso		Escaso		Sí C--GR
14a. Naringenina	Ausente		Ausente		Escaso		Sí CG--R
14b. Flavanona	Ausente		Ausente		Escaso		Sí CG--R
16a. Flavanona	Ausente		Ausente		Escaso		No -CGR-
22a. Flavanona	Ausente		Escaso		Escaso		Sí C--GR
14. Luteolina	Escaso		Moderado		Ausente		Sí CR--G
17a. Der. apigenina	Ausente		Escaso		Ausente		No -CGR-
19a. Apigenina	Ausente		Escaso		Ausente		Sí CR--G

24.Sesquiterpeno(?)	Abundante	Escaso	Moderado	Sí C-G-R
25.Sesquiterpeno(?)	Abundante	Moderado	Moderado	No -CGR-
25a.Sesquiterp.(?)	Ausente	Escaso	Escaso	Sí C--GR
26.Sesquiterpeno(?)	Moderado	Moderado	Escaso	No -CGR-
7a. No identificado	Ausente	Abundante	Ausente	Sí CR--G
13b. No ident.	Ausente	Abundante	Moderado	Sí C-G-R
13c. No ident.	Ausente	Moderado	Moderado	Sí C--GR
13. No identificado	Moderado	Moderado	Escaso	Sí C-G-R
15. No identificado	Escaso	Abundante	Ausente	Sí C-G-R
18. No identificado	Moderado	Moderado	Moderado	No -CGR-
19. No identificado	Moderado	Moderado	Moderado	No -CGR-
20a. No ident.	Ausente	Ausente	Escaso	Sí CG--R
21. No identificado	Moderado	Moderado	Moderado	Sí CG--R
22. No identificado	Moderado	Escaso	Moderado	Sí CR--G
23. No identificado	Moderado	Ausente	Moderado	Sí C-G-R
$\alpha$ -Pineno	Moderado	Abundante	Abundante	Sí C--GR
$\beta$ -Pineno	Moderado	Ausente	Escaso	Sí C-G-R
Mirceno	Moderado	Ausente	Escaso	Sí C-G-R
Limoneno	Moderado	Moderado	Moderado	No -CGR-
1,8-Cineol	Moderado	Muy abunda.	Abundante	Sí C--GR
p-Cimeno	Muy abunda.	Escaso	Moderado	Sí C-G-R
Pinocarvona	Moderado	Abundante	Moderado	Sí CR--G
Terpinen-4-ol	Moderado	Ausente	Moderado	Sí C-G-R
trans-pinocarveol	Moderado	Moderado	Moderado	No -CGR-
Criptona	Abundante	Ausente	Moderado	Sí C-G-R
Ac. $\alpha$ -terpinilo	Ausente	Moderado	Ausente	Sí CR--G
$\alpha$ -Terpineol	Moderado	Moderado	Moderado	No -CGR-
Cuminaldehído	Abundante	Ausente	Moderado	Sí C-G-R
Viridiflorol	Moderado	Ausente	Moderado	Sí CR--G
Globulol	Moderado	Abundante	Ausente	Sí C-G-R
Espatulanol	Abundante	Ausente	Moderado	Sí CR--G

Dif/Agrup. = Diferencias significativas/Agrupamientos entre especies por semejanza. \* = 10 %; \*\* = 5 %; \*\*\* = 1 %.  $\bar{x}$  = Media. CV = Coeficiente de variación. C = *E. camaldulensis*. G = *E. globulus*. R = *E. rudis*.

Los análisis univariantes de los extractos y los aceites esenciales de hojas muestran las siguientes características:

1. Los extractos de hojas presentan rendimientos de extracción globales y etéreos y contenidos en fenoles totales más altos que las maderas y cortezas dentro de cada especie. Los valores medios en orden creciente corresponden a *E. globulus*, *E. rudis* y *E. camaldulensis*, aunque los agrupamientos son distintos para cada variable.

2. El grupo de ácidos y aldehídos fenólicos es el menos abundante cuando se comparan los extractos de hojas con los de madera y corteza. La pareja ácido gálico/ácido elágico produce el mismo tipo de agrupamiento, pero con diferencias más acusadas para el ácido gálico.

3. El grupo de elagitaninos tiene menor significación en hojas que en madera y en corteza, si bien los componentes 11a y 13a se desmarcan del resto, dando valores de abundante en el *E. globulus* y forzando, por ello, un agrupamiento CR--G.

4. Los flavonoides encontrados en hojas pertenecen a los tres grupos de flavonoles, flavanonas y flavonas, de los que el más abundante es el de flavonoles. De ellos, los glicósidos de mayor relevancia (7, 9, 10, 11, 12) dan lugar al mismo agrupamiento CR--G, mientras que los aglicones, en menor cantidad en todas las especies, producen diversidad de agrupamientos. Flavonas y flavanonas tienen un escaso interés por su baja frecuencia de aparición en las tres especies.

5. Los componentes de los picos 24, 25, 25a y 26, a los que hemos atribuido una posible naturaleza sesquiterpénica, no parecen presentar el mismo patrón de comportamiento en las tres especies.

6. Entre los componentes del grupo de sustancias no identificadas, con diversa relevancia en las tres especies (7a, 13b y 15 son abundantes en *E. globulus*,) no se aprecia un nivel de semejanza importante.

6. El análisis de aceites esenciales revela un mayor número de diferencias significativas. Solamente en tres casos, limoneno, *trans*-pinocarveol y  $\alpha$ -terpineol, el análisis univariante no revela diferencias significativas. Asimismo, es el grupo de variables en que se aprecia mayor separación



entre especies (mayor número de veces repetido el agrupamiento C-G-R).

A continuación, se va a comparar la distribución que generan una serie de variables presentes a la vez en madera, corteza y hojas. No se pueden comparar las abundancias relativas entre tejidos, puesto que la extracción se realiza a partir de distintas cantidades en cada caso, pero sí los agrupamientos que genera cada variable):

a) Acido gálico. Aunque no se trata de un componente mayoritario, marca diferencias significativas en los distintos tejidos analizados. En los dos casos en que se ha podido tratar la variable como continua, se han obtenido diferencias significativas al 1 %. Sin embargo, los agrupamientos obtenidos en los tres casos son distintos.

b) Vainillina. Presenta un comportamiento distinto en los tres tejidos analizados. En madera no presenta diferencias significativas, constituyendo un componente minoritario en los extractos. En corteza presenta diferencias significativas, aunque la concentración es muy baja (en *E. globulus* está ausente). En hojas, *E. rudis* se desmarca de los demás, con una elevada concentración de vainillina.

c) Acido elágico. Es uno de los componentes mayoritarios en casi todas las muestras. No manifiesta diferencias significativas en madera. Sin embargo, en corteza, se obtiene un agrupamiento CG--R, dadas las especiales características de la corteza del *E. rudis* de Pontevedra, que reducen la media de los contenidos de ácido elágico de este bloque de muestras. En hojas, las concentraciones son muy elevadas y se obtienen diferencias significativas al 5 % entre especies.

d) Quercetina. La relevancia de los contenidos de quercetina en madera es escasa. Sin embargo, se puede destacar que en

corteza y en hojas, el agrupamiento entre especies es el mismo: CG--R.

e) Naringenina. Pese a la escasa relevancia de esta variable, podemos comentar el hecho de que este componente está presente en madera y corteza de *E. camaldulensis* y *E. globulus*, pero ausente en estos tejidos de *E. rudis*; sin embargo, está ausente en hojas de *E. globulus* y *E. camaldulensis*. Un muestreo de mayor tamaño nos permitiría profundizar en este peculiar comportamiento.

f) Existen dos elagitaninos comunes en madera, corteza y hojas. El pico 15 de maderas, que equivale al 13 de cortezas y al 13a de hojas, y el 19 de maderas, que equivale al 21 de cortezas y al 20b de hojas. El primero, el más característico de los elagitaninos en los extractos, da lugar al mismo agrupamiento entre especies CR--G. El segundo no muestra diferencias significativas ni en madera ni en cortezas, y, sin embargo, su ausencia en las hojas de *E. camaldulensis* determina un agrupamiento C--GR en este caso.

g) Existe un flavonol (pico 17a de maderas, que equivale a 18 de corteza y 16 de hojas) cuya presencia no parece seguir un ordenamiento relacionado en los otros tres tejidos.

#### 4.2. ANALISIS MULTIVARIANTES

El conjunto de análisis multivariantes realizados pretenden dar mayor rigor y consistencia a los comentarios hechos sobre los resultados univariantes.

Las tablas X.4.4, X.4.5, X.4.6, X.4.7 y X.4.8 reúnen los resultados del análisis multivariantes, representando los valores medios de las proyecciones sobre los dos primeros ejes canónicos de los valores de la nube de puntos del conjunto de variables estudiadas.

Tabla X.4.4: Análisis multivariantes para el agrupamiento de ácidos y aldehídos fenólicos

	<i>E. camaldulensis</i>				<i>E. globulus</i>				<i>E. rudis</i>			
	Eje 1		Eje 2		Eje 1		Eje 2		Eje 1		Eje 2	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
MADERA	-96	(65)	40	(75)	32	(135)	13	(95)	-11	(139)	-71	(7)
CORTEZA	-25	(8)	15	(35)	51	(83)	0	(19)	-13	(12)	-9	(8)
HOJAS	202	(81)	-110	(63)	-144	(64)	-63	(80)	69	(190)	251	(84)

Tabla X.4.5: Análisis multivariantes para el agrupamiento de elagitaninos

	<i>E. camaldulensis</i>				<i>E. globulus</i>				<i>E. rudis</i>			
	Eje 1		Eje 2		Eje 1		Eje 2		Eje 1		Eje 2	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
MADERA	-92	(30)	-61	(78)	73	(228)	109	(144)	48	(337)	-70	(171)
CORTEZA	55	(42)	11	(25)	4	(38)	-13	(8)	-14	(12)	8	(8)
HOJAS	75	(21)	21	(42)	-8	(24)	-10	(14)	17	(63)	-2	(30)

Tabla X.4.6: Análisis multivariantes para los agrupamientos de flavonoles

	<i>E. camaldulensis</i>				<i>E. globulus</i>				<i>E. rudis</i>			
	Eje 1		Eje 2		Eje 1		Eje 2		Eje 1		Eje 2	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
MADERA	0	(0)	0	(0)	5	(82)	5	(14)	-41	(3)	2	(17)
CORTEZA	7	(43)	3	(14)	12	(49)	-2	(11)	0	(0)	0	(0)
HOJAS												
Grupo 1	-6	(31)	-10	(10)	82	(81)	-2	(2)	-35	(70)	16	(34)
Grupo 2	-35	(40)	1	(10)	172	(3)	0	(2)	-40	(23)	1	(25)
Grupo 3	-34	(36)	6	(23)	172	(3)	1	(3)	-47	(7)	4	(29)
Grupo 4	-31	(28)	6	(17)	-36	(36)	-10	(9)	30	(94)	8	(20)
Grupo 5	-7	(78)	15	(40)	172	(13)	32	(85)	-60	(9)	0	(15)

Tabla X.4.7: Análisis multivariantes para el agrupamiento de flavanonas												
	<i>E. camaldulensis</i>				<i>E. globulus</i>				<i>E. rudis</i>			
	Eje 1		Eje 2		Eje 1		Eje 2		Eje 1		Eje 2	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
MADERA	51	(101)	1	(10)	-10	(29)	0	(1)	-65	(45)	0	(8)
CORTEZA	-36	(80)	-1	(7)	73	(45)	0	(14)	0	(0)	0	(0)
HOJAS	0	(0)	0	(0)	293	(447)	0	(0)	-325	(364)	-4	(127)

Tabla X.4.8: Análisis multivariantes para el agrupamiento de terpenos												
	<i>E. camaldulensis</i>				<i>E. globulus</i>				<i>E. rudis</i>			
	Eje 1		Eje 2		Eje 1		Eje 2		Eje 1		Eje 2	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
HOJAS												
Terp 1	41	(176)	138	(182)	74	(83)	-58	(80)	-150	(171)	-3	(49)
Terp 2	-52	(8)	18	(7)	82	(9)	2	(22)	-49	(6)	-19	(4)
Terp 3	-332	(127)	131	(82)	825	(40)	14	(150)	-478	(107)	-63	(11)
Terp 4	82	(12)	24	(6)	213	(5)	0	(2)	-83	(1)	25	(7)

La representación gráfica de estas tablas se expone en las figuras siguientes.

De estos resultados se deduce:

1. Ácidos y aldehídos fenólicos (figura X.4.1). El solapamiento de las proyecciones generadas por los contenidos de ácidos y aldehídos fenólicos demuestra que este grupo de variables no posibilita la discriminación entre especies en madera y corteza. Sin embargo, en hojas, las tres poblaciones se hallan completamente separadas, lo que determina que el contenido de ácidos y aldehídos fenólicos podría utilizarse como factor discriminante entre especies.

La distribución espacial relativa de los centroides de las poblaciones de las tres especies se mantiene al comparar madera, corteza y hojas, si bien la separación entre especies es mayor en hojas.

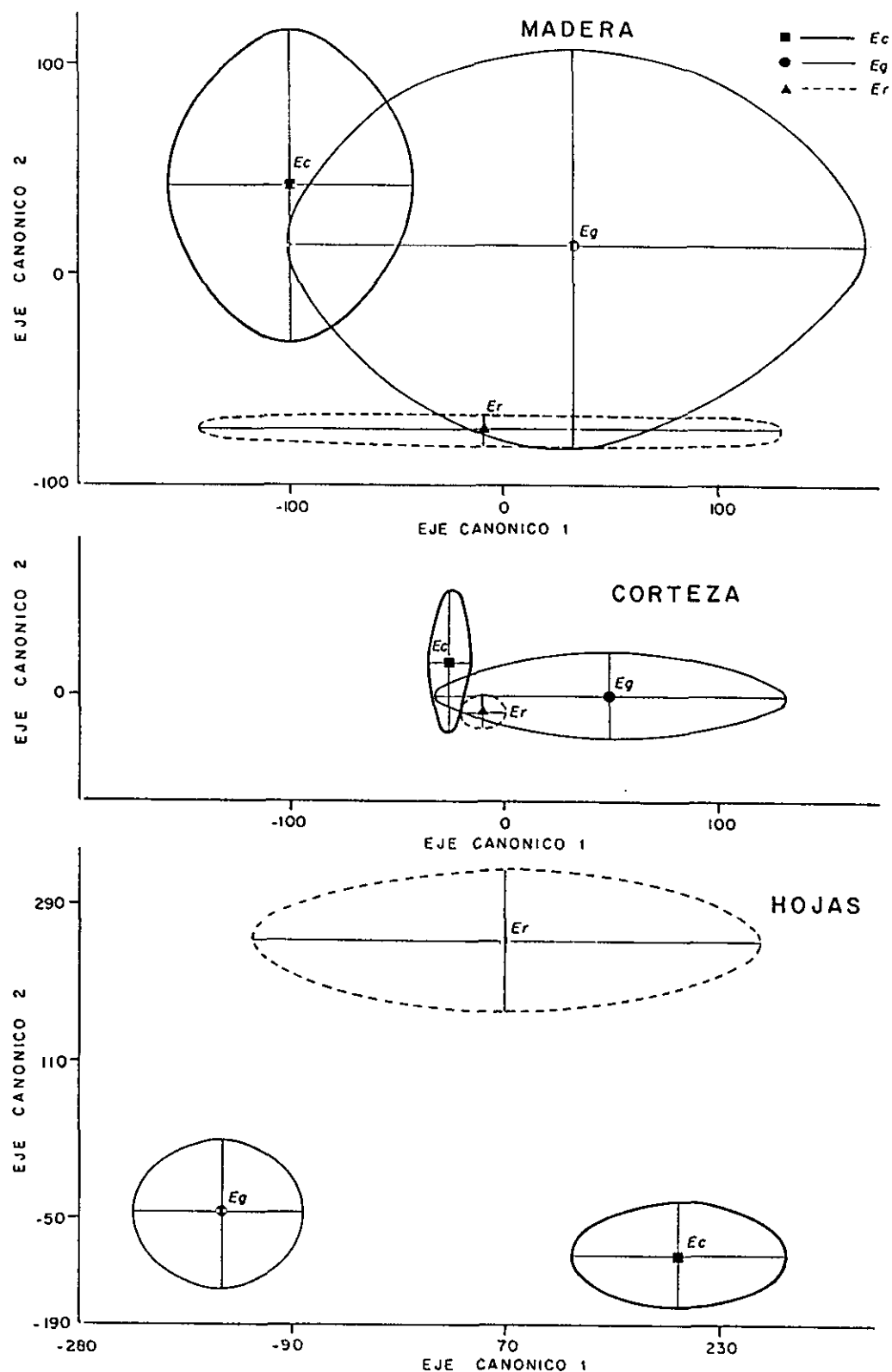


Figura X.4.1.: Análisis multivariante del agrupamiento de ácidos y aldehídos fenólicos. Proyecciones sobre los dos ejes canónicos principales de los centroides de las muestras de cada especie.

2. Elaqitaninos (figura X.4.2). No parece un buen grupo discriminante, dado que en ninguno de los tejidos deja de existir solapamiento entre, al menos, dos de las especies estudiadas.

El caso de solapamiento más acusado se da en madera, y la mejor separación en corteza. Sin embargo, en este último caso, la separación parece determinada por la pequeña variabilidad del *E. rudis*, consecuencia de las especiales características de su corteza.

3. Flavanonas (figura X.4.3). El agrupamiento de flavanonas no resulta, en ningún caso, un buen ejemplo de componentes químicos diferenciadores de especies.

4. Flavonoles. Este agrupamiento de variables recibe un tratamiento especial. En la figura X.4.4, se han comparado las distribuciones de las proyecciones de las muestras de las tres especies para los agrupamientos de los flavonoles totales en madera y corteza y para el grupo 1 de flavonoles en hojas. Se ha elegido este grupo, el de aglicones de flavonol, por considerarlo el más afín químicamente a los de madera y corteza. Se aprecia en la figura que los flavonoles no proporcionan una adecuada discriminación entre especies, existiendo, además, diferencias en la distribución espacial relativa de los centroides de las tres especies para corteza, madera y hojas.

Por otro lado, la figura X.4.5 ilustra como una adecuada selección de variables mejora considerablemente la diferenciación de especies. En esta figura se compara la distribución generada por el grupo 1 de flavonoles de hojas, y las que se obtienen a partir de los grupos 3 y 5. En estos casos, se observa una clara separación del centroide de *E. globulus*, mientras que los de *E. camaldulensis* y *E. rudis* están bastante próximos. Este tipo de distribución está de acuerdo con los principios de clasificación botánica de las tres especies, ya que *E. camaldulensis* y *E. rudis* pertenecen a la misma subespecie, dentro del género *Eucalyptus*.

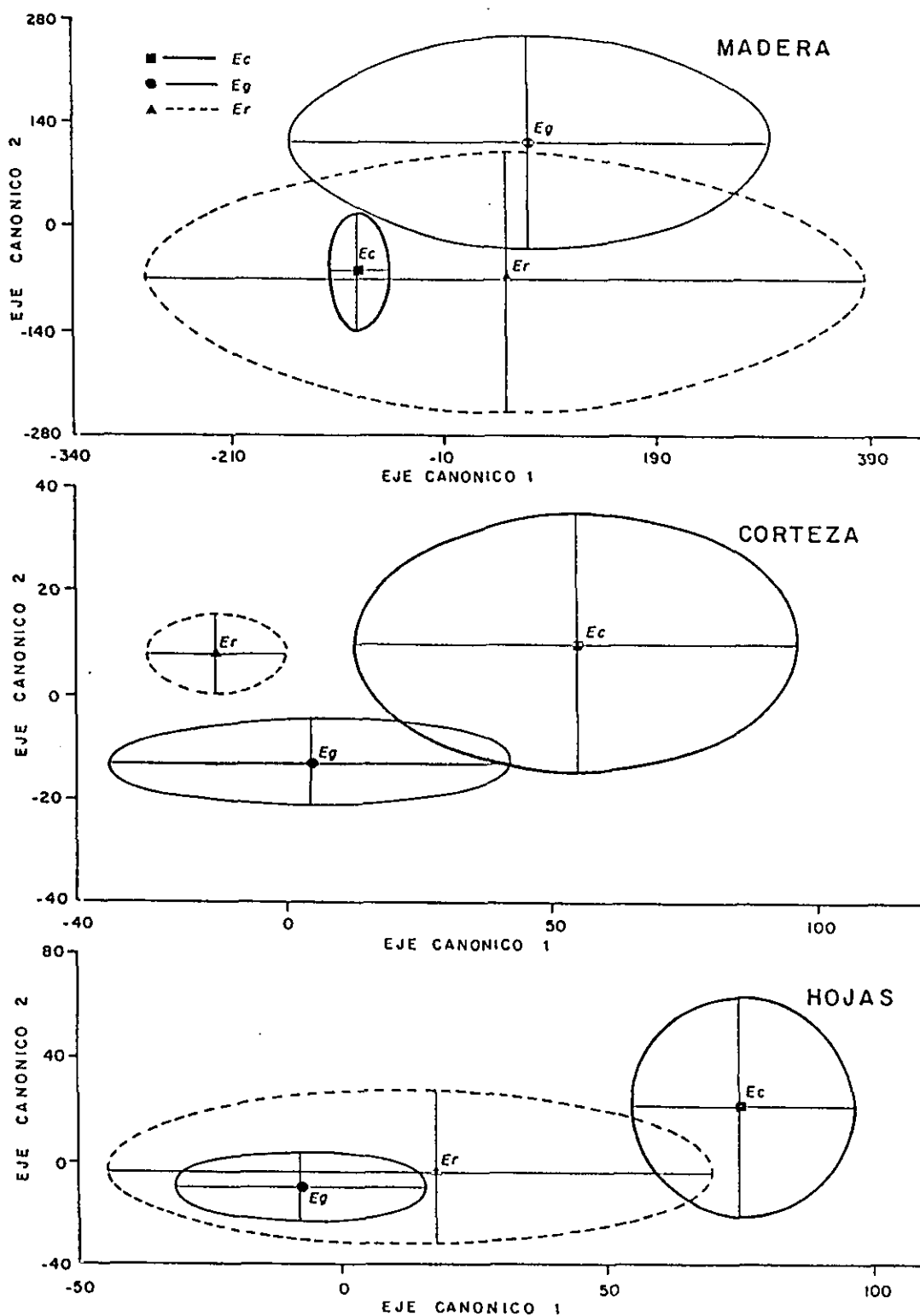


Figura X.4.2: Análisis multivariante del agrupamiento de elagitaninos. Proyecciones sobre los dos ejes canónicos principales de los centroides de las muestras de cada especie.

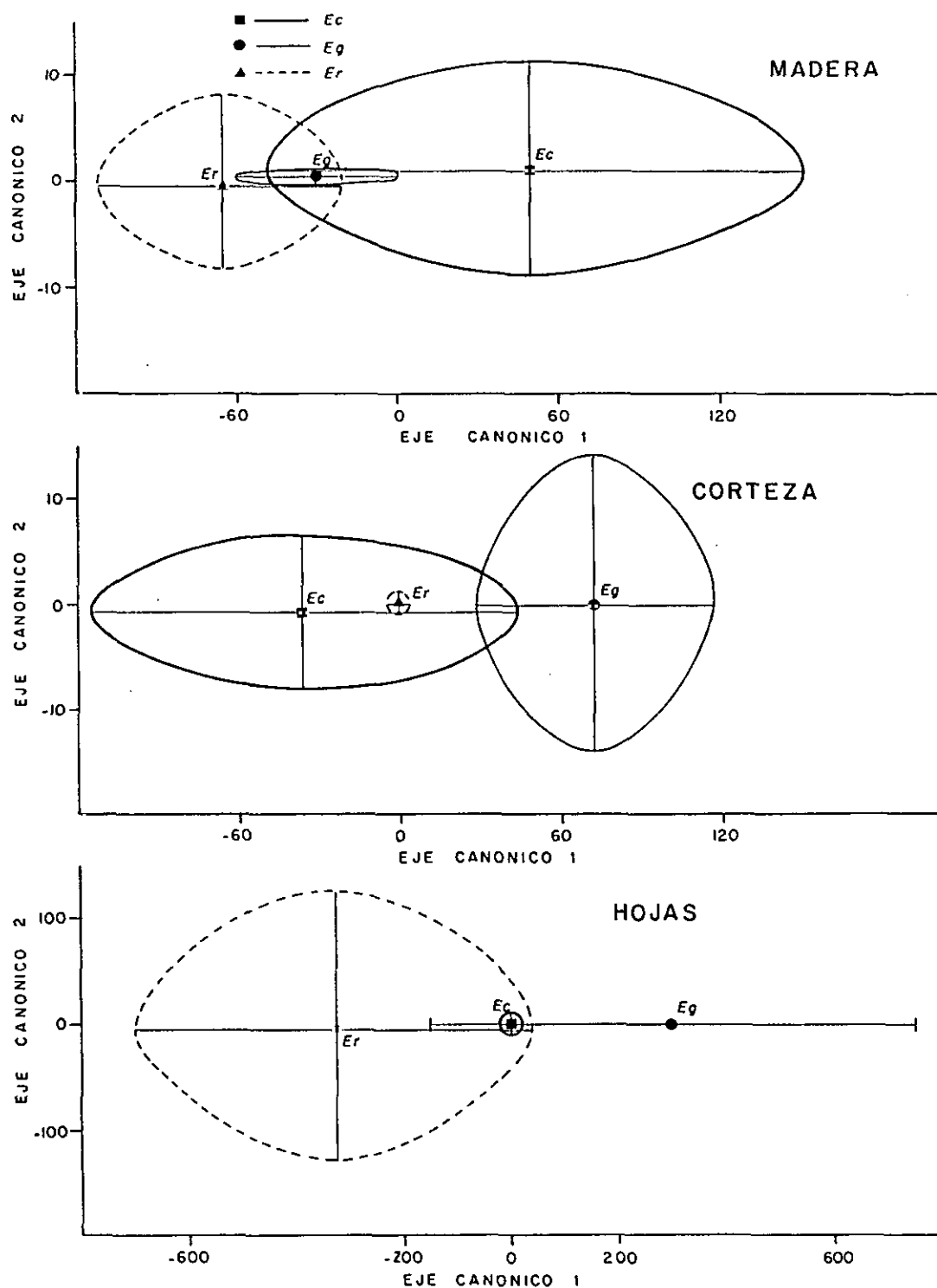


Figura X.4.3: Análisis multivariante del agrupamiento de flavanonas. Proyecciones sobre los dos ejes canónicos principales de los centroides de las muestras de cada especie.



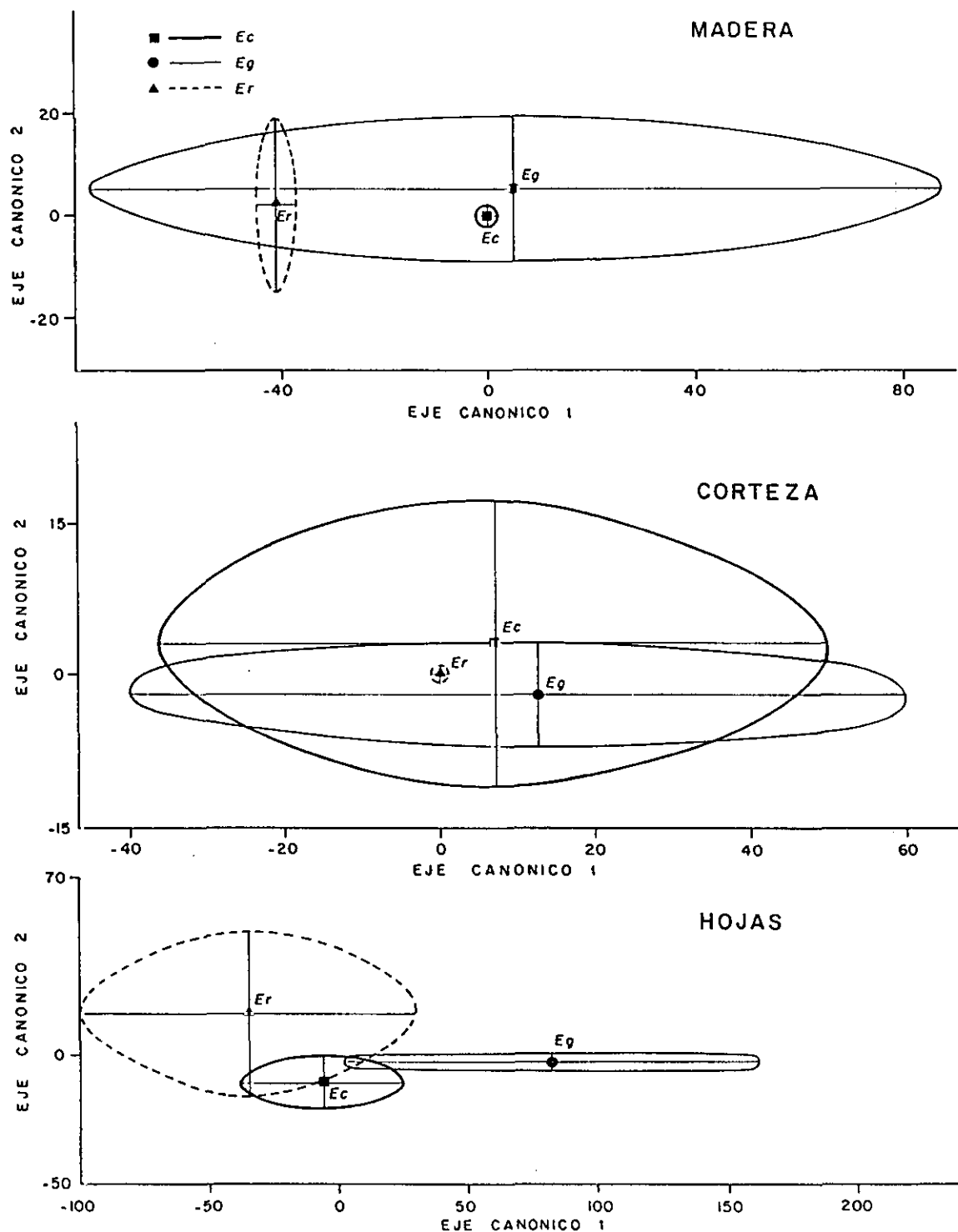


Figura X.4.4: Análisis multivariante de los agrupamientos de flavonoles en madera y corteza y del grupo de flavonoles 1 de hojas. Proyecciones sobre los dos ejes canónicos principales de los centroides de las muestras de cada especie.

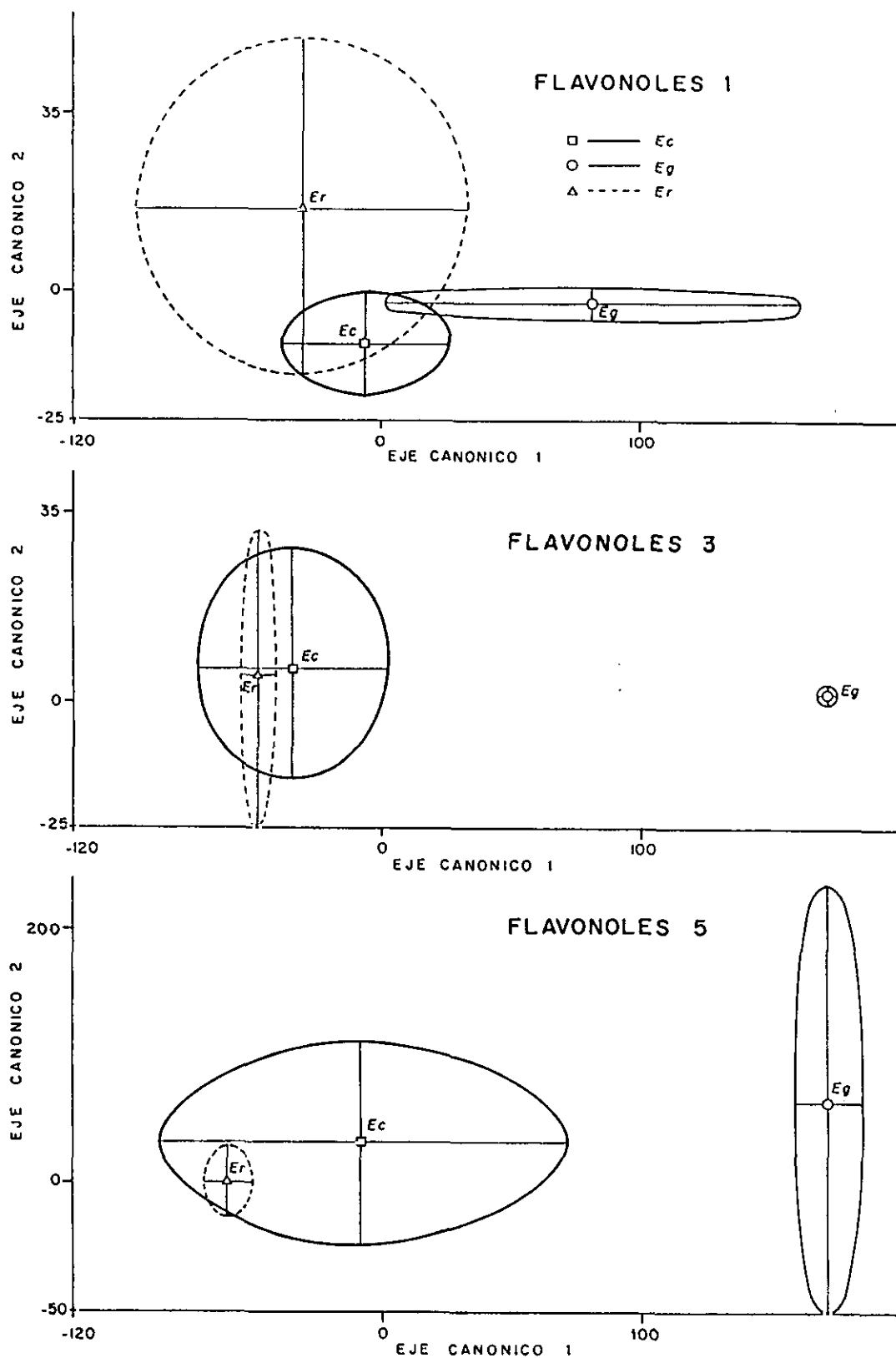


Figura X.4.5: Análisis multivariante de los agrupamientos de flavonoles 1, 3 y 5 de hojas. Proyecciones sobre los dos ejes canónicos principales de los centroides de las muestras de cada especie.

5. Componentes de los aceites esenciales. Se ha considerado conveniente analizar los agrupamientos de los componentes de los aceites esenciales, puesto que, conocida su utilidad como marcadores quimiotaxonómicos, podían servir para evaluar la validez del método matemático que se está aplicando.

La figura X.4.6 muestra los resultados de los agrupamientos de terpenos. Los dos primeros son dos agrupamientos basados en la afinidad química de sus componentes. El grupo Terpenos 1 no proporciona una adecuada separación de especies, aunque sus centroides se encuentran relativamente distanciados. El grupo Terpenos 2 es un ejemplo de una asociación de variables que permite un buen marcaje taxonómico, y que apoya la validez del método empleado.

Pero el grupo Terpenos 4 está constituido por variables seleccionadas de acuerdo con el criterio que nos ha proporcionado la primera fase de nuestro análisis matemático. Las elegidas son aquellas que en el análisis univariante han generado diferencias significativas entre las tres especies. Se observa que el distanciamiento de los centroides de las tres especies obtenido con Terpenos 4 es mayor que el de Terpenos 2, lo que contribuye a pensar en la influencia de la adecuada selección de variables en la discriminación.

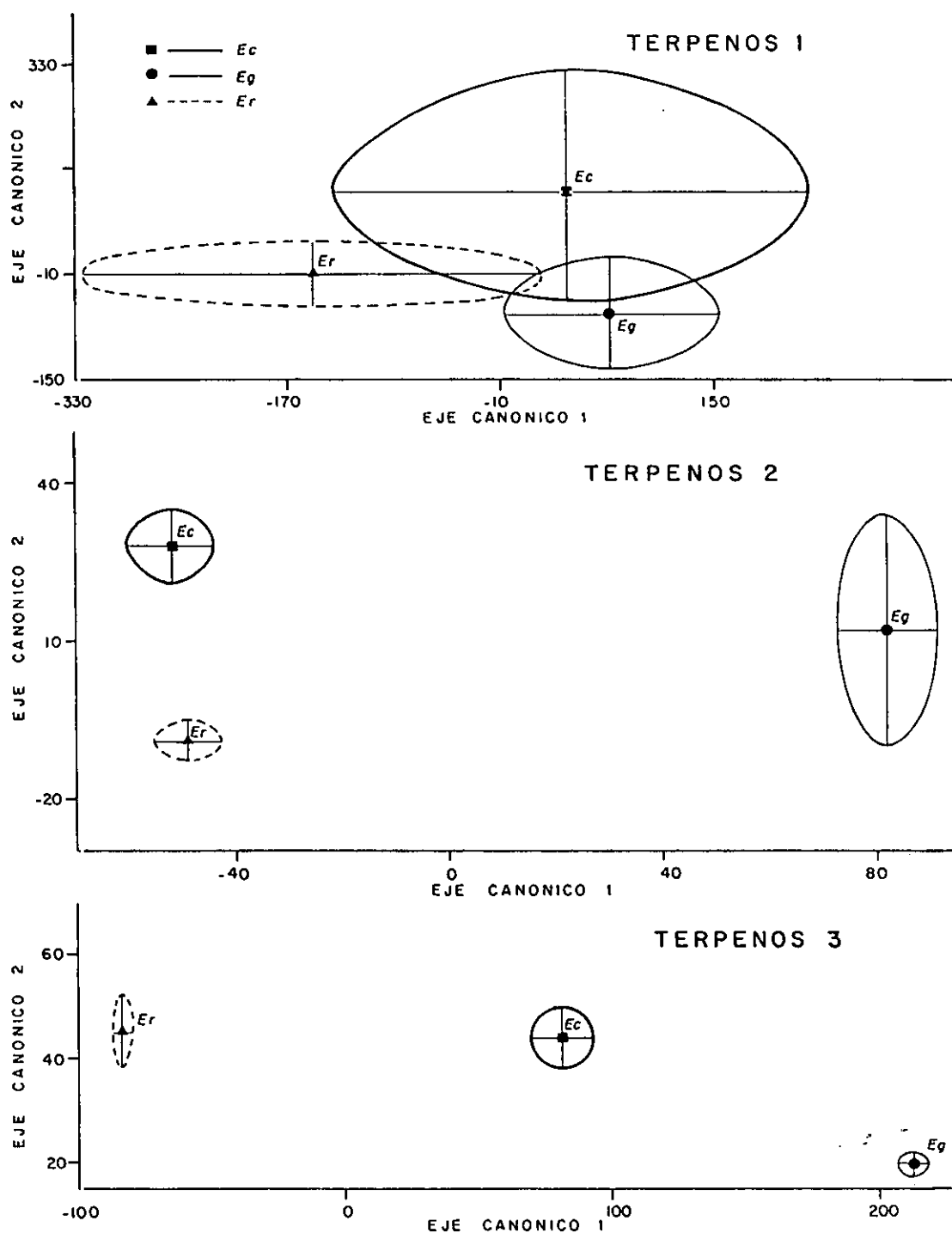


Figura X.4.6: Análisis multivariante de los agrupamientos de terpenos 1, 2 y 4 de hojas. Proyecciones sobre los dos ejes canónicos principales de los centroides de las muestras de cada especie.

#### 4.3. CONCLUSIONES

1. Los resultados de estos análisis matemáticos constituyen una aproximación al establecimiento de patrones de composición química que permitan una clasificación quimiotaconómica de las especies en estudio. El reducido número de árboles disponibles sólo permite esbozar caminos y agrupamientos para una discriminación fiable y consideramos que un mayor número de individuos mejoraría apreciablemente la discriminación. Otro factor que probablemente contribuiría a la mejora de los resultados sería la cuantificación real de cada componente, lo que implicaría la necesidad de disponer de patrones para una calibración precisa.

2. Los análisis univariantes han permitido establecer las abundancias relativas de cada componente en las tres especies, así como las diferencias entre ellas y su agrupamiento por semejanza.

3. Los análisis multivariantes, dentro de las limitaciones establecidas en el punto 1, han contribuido a reconocer aquellos grupos de componentes químicos que permiten una buena discriminación de especies para cada tejido y los que, por el contrario, no son buenos marcadores taxonómicos. Entre los primeros, los ácidos y aldehídos fenólicos, algunos grupos de flavonoles y alguno de terpenos en hojas. Entre los segundos, destacan flavanonas y elagitaninos, que no facilitan la diferenciación en madera, corteza ni en hojas.

## **XI. CONCLUSIONES**

## XI. CONCLUSIONES

1. El estudio de la composición polifenólica de madera, corteza y hojas ha requerido el desarrollo de métodos de extracción de alto rendimiento que no alterasen la estructura de estos compuestos, y la aplicación de técnicas analíticas cada vez más sensibles y precisas para su valoración e identificación.

2. Las distintas partes del árbol presentan grandes diferencias en los valores de rendimientos de extracción y de contenidos en fenoles totales. En todas las especies, las hojas dieron los máximos valores de estas variables. La excepción son las cortezas de *E. globulus*, para las que se obtuvieron mayores valores de rendimientos de extractos en éter que para las correspondientes maderas y hojas.

Son destacables los amplios rangos de dispersión de los valores de rendimientos globales y de contenidos en fenoles totales en las cortezas de *E. camaldulensis* y *E. rudis*. En estas últimas, la relación entre rendimiento y contenido en fenoles totales fue diferente a la encontrada en las otras especies.

3. También se aprecian diferencias cualitativas en la composición polifenólica de las distintas partes del árbol. El patrón de composición más complejo corresponde a las hojas y el más simple a la madera.

La característica principal de las maderas es su mayor concentración y variedad de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular (ácidos gálico, vainíllico y elágico, aldehído siríngico, vainillina y un derivado del ácido o del aldehído siríngico); una amplia diversidad de elagitaninos y la ausencia prácticamente total de flavonoides.

Las cortezas presentan contenidos variables de diversos ácidos y aldehídos fenólicos (ácidos gálico, vainíllico, protocatéquico, siríngico y elágico, y los aldehídos

protocatéquico y vainillina). La concentración y variedad de elagitaninos es también elevada. En cuanto a los flavonoides, se ha detectado la presencia de algunas flavanonas (naringina, eriodictyol, naringenina y otras no identificadas) y algunos flavonoles (quercitrina, quercetina, kaempferol y otro sin identificar) y se han identificado dos flavonas, luteolina y apigenina y un dihidroflavonol, taxifolina, aunque en un número muy reducido de muestras.

En las hojas, los componentes más destacados son ahora los glicósidos de flavonol, y entre ellos, el quercetín-3-arabinósido, el quercetín-3,7-diramnósido, la quercitrina y el kaempferol-3-arabinósido. También se han detectado aglicones de flavonol, flavanona y flavona, con diversa distribución entre las distintas muestras. Sin embargo, los ácidos y aldehídos fenólicos y los elagitaninos tienen poca relevancia.

4. Existen diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición polifenólica entre las tres especies de *Eucalyptus* estudiadas.

Con la excepción de las hojas, las muestras de *E. rudis* presentan patrones de composición más sencillos que las de *E. globulus* y *E. camaldulensis*. La característica diferenciadora es la escasa presencia de flavonoides en las maderas y cortezas de *E. rudis*.

Al comparar las muestras de *E. globulus* y *E. camaldulensis*, se aprecian ligeras diferencias. En las maderas, en la concentración relativa de los distintos elagitaninos y en la presencia o ausencia de flavonoles y flavanonas en ambas especies. En las cortezas, la diferencia se centra en la mayor abundancia de elagitaninos en *E. globulus*.

La composición química de las hojas diferencia a *E. globulus* de *E. camaldulensis* y *E. rudis*. El primero se caracteriza por una menor variedad de glicósidos de flavonol (sólo se ha detectado



quercitrina) y unos altos contenidos en elagitaninos. Por el contrario, *E. camaldulensis* y *E. rudis* presentan diversos glicósidos de flavonol y sus concentraciones de elagitaninos son muy bajas.

5. No se observa relación entre las diferencias en la composición polifenólica en las muestras y sus procedencias. *E. camaldulensis* es la única especie para la que se han podido apreciar diferencias significativas, tanto entre muestras de distinta procedencia, como entre las de una misma procedencia. Esto nos hace pensar que estas diferencias tienen un origen genético y no son debidas únicamente a factores medioambientales. Un caso aparte lo constituyen las cortezas de *E. rudis*. La distinta composición de las muestras de ambas procedencias está relacionada con unas drásticas diferencias morfológicas. Estas pueden ser debidas a la mala aclimatación de esta especie a las condiciones ambientales de Galicia, o a algún otro factor fuera de nuestro control.

6. Los resultados de los análisis matemáticos realizados constituyen una aproximación al establecimiento de perfiles de composición química que permitan una clasificación quimiotaconómica de las especies en estudio. El reducido número de muestras analizadas sólo permite esbozar caminos y agrupamientos para una discriminación fiable. Un mayor número de individuos y una cuantificación precisa de todos los componentes mejorarían los resultados.

Los análisis multivariantes desarrollados han permitido reconocer aquellos grupos de componentes químicos que posibilitan una buena discriminación de especies para cada tejido u órgano, y los que, por el contrario, no son buenos marcadores taxonómicos. Entre los primeros, los ácidos y aldehídos fenólicos, algunos grupos de flavonoles y algunos terpenos en hojas. Entre los segundos, destacan flavanonas y elagitaninos que no permiten una clara diferenciación en madera, corteza ni en hojas.

7. En el análisis de hojas, las diferencias entre muestras individuales establecidas en base a su composición polifenólica suelen coincidir con las observadas en el estudio de sus aceites esenciales.

8. Las diferencias encontradas en la composición polifenólica de las muestras de madera de las tres especies no parecen justificar su distinta aptitud para producir pasta de papel, citada en la bibliografía.

Por otro lado, los resultados de los análisis normalizados de holocelulosa, ligninas y pentosanos, etc., confirman las mejores propiedades de las maderas de *E. globulus* analizadas, pero no marcan grandes diferencias entre las tres especies. Esto hace pensar que quizás los ejemplares analizados se distancien del comportamiento típico descrito para ellas.

9. Respecto al aprovechamiento de estos residuos forestales como materia prima para la obtención de polifenoles de interés en la industria farmacéutica o química, los resultados de las valoraciones de los compuestos fenólicos han permitido establecer que:

- Las maderas y las cortezas podrían ser utilizadas para la extracción de ácido elágico. De entre ellas, las más adecuadas serían las cortezas de *E. globulus*, no solo por sus altos contenidos del propio ácido, sino también por sus elevadas concentraciones de elagitaninos, que por hidrólisis pueden liberar el ácido.

- De las hojas se pueden extraer los glicósidos flavonoídicos. Principalmente, se puede recomendar la extracción de quercetín-3-arabinósido y kaempferol-3-arabinósido de hojas de *E. camaldulensis* y *E. rudis*, quercetín-3,7-diramnósido a partir de hojas de *E. camaldulensis* y de quercitrina de hojas de *E. globulus*.

## **XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

### XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABD-ALLA M. F., EL-NEGOUMY S. I., EL-LAKANY M. H., SALEH N. A. M. (1980). Flavonoid glycosides and the chemosystematics of *Eucalyptus camaldulensis*. *Phytochem.* 19(12): 2629-2632.
- ABBOTT M. T., UDENFRIEND S. (1974). En O. Hayashi (Ed.). *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*. Academic Press. New York. p. 187-214.
- ADZET T., CAÑIGUERAL S., IGLESIAS J. I. (1988). A chromatographic survey of polyphenols from *Salvia* species. *Biochem. system. ecol.* 16: 29-32.
- AFIFI A. A., CLARK V. (1990). *Computer-Aided Multivariate Analysis*. 2ª Ed. Van Nostrand Reinfield Company. New York.
- AGARWAL O. P. (1982). The antiinflammatory action of nepitrin, a flavonoid. *Agents and Actions* 12: 298-302.
- ALBORNOZ A. (1980). *Productos naturales. Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- ALIBERT G. (1975). *Les acides phenoliques et leur metabolisme chez Quercus pedunculata*. Tesis doctoral. Universidad de Toulouse.
- ALLUE ANDRADE J. L. (1990). *Atlas fitoclimático de España*. MAPA. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid.
- ALONSO AGUILAR L. (1976). *Análisis químico de maderas de diferentes especies forestales*. *Comunicaciones INIA. Serie Tecnología Agraria*. 2.

ANDERSEN O. M. (1985). Chromatographic separation of anthocyanins in cowberry (lingonberry) *Vaccinium vitis-idaea* L. *J. Food Sci.* 50(5): 1230-1232.

ANDERSEN R. A., KASPERBAUER M. J. (1971). Effects of near-ultraviolet radiation and temperature on soluble phenols in *Nicotiana tabacum*. *Phytochem.* 10(6): 1229-1231.

ANDREEVA O. A., BANDYUKOWA V. A., LEONT'EVA T. P., REKKANUT S. A. (1987). Flavonoids of *Vicia trunculata* Fisch. ex. Bieb. and their pharmacological activity. *Restit. Resur.* 23: 96-100.

ANONIMO (1958). Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel. E. Merck. Darmstadt.

ANTONOVSKII S. D., CHOCHIEVA M. M., KAMENEVA I. N. (1977). Effect of pulsating hydraulic pressure in the yield and composition of water-soluble substances extracted from larchwood. *Khim. Mekh. Perarab. Dev. Otkhodov.* 3: 53-58.

APPEL H. M. (1993). Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *J. Chem. Ecol.* 19(7): 1521-1552.

ARAUJO-LIMA O., POLONSKYJ. (1973). Les constituants flavonoides de *Cephalanthus spathelliferus*. *Phytochem.* 12: 913-916.

ARPINO P., MOREAU J. P., ORUEZABAL C., FLIEDER F. (1971). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of tanin hydrolysates from the ink of ancient manuscripts (XIth to XVIth century). *J. Chromatogr.* 134: 433-439.

ASEN S. (1982). Identification of flavonoid chemical markers in roses and their high-pressure liquid chromatographic resolution and quantitation for cultivar identification. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 107(5): 744-750.

ASEN S. (1984). High-pressure liquid chromatographic analysis of flavonoid chemical markers in petals from *Gerbera* flowers as adjunct for cultivar. *Phytochem.* 23: 2523-2526.

BAKER R. T., SMITH H. G. (1920). A research on the eucalypts especially in regard to their essential oils. Technical Education Series, nº 24. Technological Museum. Nueva Gales del Sur.

BAKER W., OLLIS W. D. (1961). En W. D. Ollis (Ed.). *Recent developments in the Chemistry of Natural Phenolic compounds*. Pergamon Press.

BAILEY R. W., BOURNE E. J. (1960). Color reactions given by sugars and diphenylamine-aniline spray reagents on paper chromatograms. *J. Chromatogr.* 4: 206-213.

BAILLY J. R., RABOANARY M. (1984). Chromatographie couche mince de composés phénoliques simples. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols* 12: 549-553.

BAJ A., BOMBARDELLI E., GABETTA B., MARTINELLI E. M. (1983). Qualitative and quantitative evaluation of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins by high-resolution gas chromatography and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 279: 365-372.

BAKER R. T., SMITH H. G. (1920). A research on the eucalypts specially in regard to their essential oils. Technical Education Series nº 24. Technological Museum. New York.

BANKOVA V. S., POPOV S., MAREKOV N. L. (1982). High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *J. Chromatogr.* 242(1): 135-143.

BANKS J. C. G., HILLIS W. E. (1969). *Aust. J. Botany* 17: 133. (Ref. ABD-ALLA et al., 1980).

BANWART W. L., PORTER P. M., GRANATO T. C., HASSETT J. J. (1985). HPLC separation and wavelength area ratios of more than 50 phenolic acids and flavonoids. *J. Chem. Ecol.* 11(3): 383-395.

BARBERAN F. A., FERRERES F., TOMAS F., GUIRADO A. (1986). Electron impact mass spectrometric differentiation of 5,6-dihidroxi-7,8-dimetoxi and 5,8-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavones. *Phytochem.* 25(4): 923-925.

BARNAULOV O. D., MANICHEVA O. A., SHELYOTO V. I., KONOPLEVA M. M., GLYZIN V. I. (1984). Effect of flavonoids on the development of experimental dystrophy of the stomach in mice. *Khim. Farm. Zh.* 18(8): 935-941.

BARZ W., WELTRING K. M. (1985). En T. Higuchi (Ed.). *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Academic Press. New York. p. 607-666.

BATE-SMITH E. C. (1962). The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *J. Linn. Soc. (Bot.)*. 58: 95.

BAUMANN J., BRUCHHAUSEN F. V., WURM G. (1980). Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins* 20(4): 627-639.

BAUMANN J., WURM G., BRUCHHAUSEN H. (1980). *Arch. Pharm.* 313: 330. (Ref. PATHAK *et al.*, 1991).

BAZAN A. C., KNAPP D. R. (1982). Improved derivative of 6-keto-prostaglandin Fla for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr.* 236: 210-207.

BECKER C. G., HAJJAR D. P., HEFTON J. M. (1985). Tobacco constituents are mitogenic for arthelial smooth-muscle cells. *Am. J. Pathol.* 120(1): 1-5.

BELADI I., MUSCI I., PUSTZAI R., BAKAY M., ROSZTOCZY I., GABOR M., VECKENSTEDT A. (1981). In vitro and in vivo antiviral effects of flavonoids. *Stud. Org. Chem.* 11: 443-450.

BENINGTON F., CHRISTIAN J. T., MORIN R. D. (1975). Identification and separation of indolealkylamines by gas-liquid chromatographic analysis of their heptafluorobutyryl derivatives. *J. Chromatogr.* 106: 435-439.

BENKO S., GABOR M., VARKONYI T., ANTAL A., FOLDI M. (1970). Brain edema and subpleural hemorrhage in experimental P-avitaminosis. *Physiol. Chem. Phys.* 2(2): 110-116.

BESCHIA M., LEONTE A., OANCEA I. (1982). Phenolic constituents with biological activity. II. Determination of components in water plants. *Bull. Univ. Galati. Fasc. 6, 5*: 23-27.

BICK I. R. C., BROWN R. B., HILLIS W. E. (1972). Three flavanones from leaves of *Eucalyptus sieberi*. *Aust. J. Chem.* 25(2): 449-451.

BINDER H. (1980). Separation of monosaccharides by high-performance liquid chromatography: Comparison of ultraviolet and refractive index detection. *J. Chromatogr.* 189: 414-420.

BINDER S. R., SIVORINOVSKY G. (1984). Measurement of urinary vanilmandelic acid and homovanillic acid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection following extraction by ion exchange and ion-moderated partition. *J. Chromatogr.* 336: 173-188.

BLAND D. E. (1985). The composition and analysis of eucalypt wood. *Appita* 38(4): 291-294.

BLOUIN F. A., ZARINS Z. M. (1988). High performance liquid chromatography of cottonseed flavonoids. *J. Chromatogr.* 441(2): 443-447.



BONDARENKO L. T., PANKRATOVA A. A., PERELSON M. E. (1981). Rapid method for the quantitative determination of total flavonoids in *Datisca cannabina*. *Khim. Farm. Zh.* 15(11): 69-73.

BOUKEF K., BALANSARD G., LALEMAND M., BERNARD P. (1976). Etude des heterosides et aglycones flavoniques isoles des feuilles d'*Eucalyptus globulus* Labill. *Plantes medicinales et phytotherapie* X(1): 30-35.

BOYET C. M., JAY M. (1989). Taxonomic variation in flavonoids in the *Oryza latifolia* complex. *Biochem. system. ecol.* 17: 443-447.

BRITSCH L., HELLER W., GRISEBACH H. (1981). Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Z. Natursforsch.* 36c(9-10): 742-750.

BROWNING B. L. (1963). The chemistry of wood. Robert E. Krieger Publishing Company. Malabar. Florida.

BRYSON J. L., MITCHELL T. I. (1951). Improved spray reagents for the detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 167: 864.

BUSSE W. W., KOPP D. E., MIDDLETON E. Jr. (1984). Flavonoid modulation of human neutrophil function. *Allergy Clin. Pharmacol.* 73(6): 801-809.

BUSTAMANTE EZPELETA L., SANTOS VIQUEIRA J. A. (1983). Aptitudes de diferentes especies del género *Eucalyptus* como materia prima celulósica. *Monografías INIA* 44. Madrid.

CALDWELL M. M., ROBERECHT R., FLINT S. D. (1983). Internal filters: prospects for UV acclimation in higher plants. *Physiol. Plant* 58(3): 445-450.

CAPEROS A., ROMERO A., GARCIA-OCHOA F. (1990). Extraction of wood with solvents. *Tappi Journal* Nov.: 221-224.

CARMAN R. M. (1992). The expression of distinctive secondary metabolites by different eucalyptus species. *Aust. J. Chem.* 45(11): 1919-1921.

CARPENA O., REVILLA E., MATAIX J. I. (1980). Análisis cuantitativo de flavonoides en material vegetal. I. Metodología de extracción y determinación. *EFCE Publ. Ser.* 12 (Proc. Congr. Nac. Quím. 1980): 363-370.

CASTRO O., LOPEZ J., VERGARA A., STERMITZ F. R., GARDNER D. R. (1986). Isoflavans and a stilbene from wood of the decay resistant tropical tree *Diphyssa robinoides*. *J. Nat. Prod.* 49(4): 680-683.

CAVALLINI L., BINDOLI A., SILIPRANDI N. (1978). Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids. *Pharmacol. Res. Commun.* 10(2): 133-136.

CERECER M. J., SANTOS E., CRABBE P. (1974). Identificación de eucaliptina en hojas de *Eucalyptus citriodora*. *Rev. Soc. Quím. Mex.* 18(6): 269-270.

COURT W. A. (1977). High-performance reversed-phase liquid chromatography of naturally occurring phenolic compounds. *J. Chromatogr.* 130: 287.

COURTNEY J. L., LASSAK E. N., SPEIRS G. B. (1983). Leaf wax constituents of some myrtaceous species. *Phytochem.* 22(4): 947-949.

CRINS W. J., THOMAS J., BOHM BB. A. (1988). Non polar phenolics of seven species of *Layia* (Asteraceae). *Biochem. system. ecol.* 16: 467-469.

CULBERSON C.F., CULBERSON W. L., JOHNOSON A. (1977). Second Supplement to Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. American Bryological and Lichenological Society. St. Louis MO.

CHARRIER B., MARQUES M., HALUK J. P. (1992). HPLC analysis of gallic and ellagic acids in European oakwood (*Quercus robur* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*). *Holzforschung* 46(1): 87-89.

CHEETHAM N. W. H., SIRIMANNE P., DAY W. R. (1981). High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrate oligomers. *J. Chromatogr.* 207: 439-444.

CHIKAO N., NOBUYASU E., SHIGERU S., JUNICHI O. (1986). Flavones and flavanones as antitumor agents. *Jpn. Kokai. Tokyo Koho JP.* 61(137): 818.

CHOPIN J., BESSON E., BOUILLANT M. L. (1982). En J. B. Harborne y T. J. Mabry (Ed.). *Advances in flavonoid research 1975-1980*. Chapman and Hall. London.

DAIGLE D. J., CONKERTON E. J. (1982). High-performance liquid chromatography of 34 selected flavonoids. *J. Chromatogr.* 240(1): 202-205.

DAIGLE D. J., CONKERTON E. J. (1988). Analysis of flavonoids by HPLC: an update. *J. Liq. Chromatogr.* 11(2): 309-325.

DE LA LAMA GUTIERREZ G. (1976). Atlas del Eucalipto. Ministerio de Agricultura. INIA-ICONA.

DEDONDER R. (1952). Sugars and related compounds. *Bull. Soc. Chim. France.* 874-883.

DEL NOZAL M. J., BERNAL J. L., GOMEZ T. J., ANTOLIN A., TORIBIO L. (1992). Post-column derivatization of carbohydrates with ethanolamine-boric acid prior to their detection by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 607: 191-198.

DEWICK P. M. (1983). Phenolic compounds derived from shikimate. *Biosynthesis* 7: 45-47.

DICK W. E. (1981). Structure-taste correlations for flavans and flavanones conformationally equivalent to phyllodulcin. *J. Agric. Food Chem.* 29: 305-312.

DONDI F., KAHIE V. D., LODI G., BLO G. (1989). Solvent selectivity effects on reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoid compounds. *J. Chromatogr.* 461: 281-292.

DONIKE M. (1973). Acylation with *bis*(acylamides). N-methyl-*bis*(trifluoroacetamide), two new reagents for trifluoracetylation. *J. Chromatogr.* 78: 273-279.

DOUKENS-RENWART P., ANGENOT L. (1991). *Proc. 6<sup>th</sup> Int. Symp. Instrum. Planar Chromatograph. (Interlaken 1991). Inst. Chromatograph. Bad. Durkheim. FRG.* 265-271.

EBEL J., HAHLBROCK K. (1982). En J. B. Harborne y T. J. Mabry (Ed.) *The flavonoids. Advances in research.* Chapman and Hall. London. p. 641-679.

ECHEVERRI L. F., QUIJANO J., ENSUNCHO A. (1985). Otros flavonoides en la resina de varios *Eucalyptus* enfermos. *Actual. Biol.* 14(52): 61-63.

ECHEVERRI L. F., QUIJANO J., MONTOYA R., URIBE C., SALAMANCA R. (1986). Un metabolito de stress en la resina de diferentes *Eucalyptus*. *Rev. Latinoamericana de Química.* 16(4): 156-158.

EL-BASYOUNI S. Z., CHEN D., IBRHIM R. K., NEISH A. C., TOWERS G. H. N. (1964). The biosynthesis of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Phytochem.* 3(4): 485-492.

ELENA R., SANCHEZ O. (1991). Los pinares españoles de *Pinus nigra* Ann. Síntesis ecológica. *Monografías INIA* 81.

- EL-GAMMAL A. A., MANSOUR, R. M. A. (1986). Antimicrobial activity of some flavonoid compounds. *Zentrabl. Mikrobiol.* 141: 561-565.
- EL-KOMMOS M. E., SIDHOM M. B. (1982). The use of 2,6-dichloro-p-benzoquinone-4-chloroimine for the quantitative determination of some flavonoids. *J. Pharm. Belg.* 37(2): 150-152.
- ELKEIY M. A., DARWISH M., HASHIM F. M., KHADEGA A. A. (1966). The flavonoid contents of the leaves of certain *Eucalyptus* species grown in Egypt. *Bull. Fac. Pharm. (Cairo Univ.)* 31(1): 83-96.
- ELLIGER C. A., CHAN, B. G., WAISS A. C., LUNDIN R. E., HADDON N. F. (1980). C-glycosylflavones from *Zea mays* that inhibit insect development. *Phytochem.* 19: 293-297.
- FANSWORTH N. R., BINGEL A. S., CORDELL G. A., CRANE F. A., FONG H. H. S. (1975). *J. Pharm. Sci.* 64: 717. (Ref. MABRY y ULUBELEN, 1986).
- FARMAKALIDIS E., MURPHY P. A. (1985). Isolation of 6''-O-Acetylgenistin and 6''-O-Acetyl daidzin from defatted soyflakes. *J. Agric. Food Chem.* 33: 385.
- FERNANDEZ DE SIMON M. B. (1992). Contribución al estudio de la maduración del fruto de *Vitis vinifera*. Evolución de compuestos fenólicos C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- FERNANDEZ DE SIMON B., PEREZ-ILZARBE J., HERNANDEZ T., GOMEZ-CORDOVES C., ESTRELLA I. (1990). HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. *Chromatographia* 30(1/2): 35-37.
- FERRERES T., BARBERAN F. A. T., TOMAS T. (1986). Flavonoids from *Lavandula dentata*. *Fitoterapia* 58(3): 199-200.

FEWTRELL C. M. S., GOMPERTS B. D. (1977). Effects of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from rat mast cells. *Nature* 265: 635-636.

FICARRA P., FICARRA R., TOMMASINI A. (1984). High-performance liquid chromatography of flavonoids in *Crataegus oxyacantha* L. *Farmaco, Ed. Prat.* 39(5): 148-157.

FREUDENBERG K., WEINGES K. (1962). En T. A. Geismann (Ed.). *The chemistry of flavonoid compounds*. Pergamon Press. Oxford.

GABOR M. (1979). En J. R. Vane y J. H. Ferreira (Ed.). *Handbook of experimental pharmacology: Antiinflammatory drugs*. Springer. New York. p. 68.

GALSTON A. W. (1969). Flavonoids and phytomorphogenesis in peas. En J. B. Harborne y T. Swain (Ed.). *Perspectives in phytochemistry*. Academic Press. New York. p. 193-204.

GANDELMAN M. S., BIRKS J. W. (1982). Photooxygenation-chemiluminiscence high-performance liquid chromatographic detector for the determination of aliphatic alcohols, aldehydes, ethers and saccharides. *J. Chromatogr.* 242: 21-31.

GANGULY A. K., SESHADRI T. R. (1961). Plant leucoanthocyanidins III. Leucopelargonidin from *Eucalyptus calophylla*. *J. Chem. Soc.* 2787-2790.

GARCIA DE MARINA A., RAMOS A., DEL CASTILLO B. (1985). Determination of biochanin A, formononetina and genistein by UV-VIS spectrophotometry, fluorometry and HPLC. *Ann. Inst. Nac. Invest. Agrars. Ser: Ganad.* 22(4): 13-22.

GARCIA-MARTIN D., GARCIA-VALLEJO M. C. (1977). Comparative study of the spanish essential oil of *Eucalyptus globulus* and some other essences that could be used for the same industrial purposes. *Proceedings of the VII International Congress of Essential Oils, Kyoto, 1977*. p: 362-365.

GARCIA-RASO A., FERNANDEZ-DIAZ M., PAEZ M. I., SANZ J., MARTINEZ-CASTRO I. (1989). Gas chromatographic retention of carbohydrate trimethylsilyl ethers. III. Ketohexoses. *J. Chromatogr.* 471: 205-216.

GARCIA-RASO A., MARTINEZ-CASTRO I., PAEZ M. I., SANZ J., GARCIA-RASO J., SAURA-CALIXTO F. (1987). Gas chromatographic behaviour of carbohydrate trimethylsilyl ethers. I. Aldopentoses. *J. Chromatogr.* 398: 9-20.

GARCIA-RASO A., PAEZ M. I., MARTINEZ-CASTRO I., SANZ J. (1992). Gas chromatographic retention of carbohydrate trimethylsilyl ethers. IV. Disaccharides. *J. Chromatogr.* 607: 221-225.

GARCIA VALLEJO M. C. (1973). Aceites esenciales de *Eucalyptus macarthuri* y *E. citriodora*, aclimatados en España. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

GEHRKE C. W., LEIMER K. (1971). Trimethylsilylation of amino acids: derivatization and chromatography. *J. Chromatogr.* 57: 219-238.

GEIGER H., QUINN C. (1975) En J. B. Harborne, T. J. Mabry y H. Mabry (Ed.). *The flavonoids*. Chapman and Hall. p. 692.

GELL R. J., PINKEY J. T., RITCHIE E. (1958). Constituents of the kino of *Eucalyptus maculata*. *Aust. J. Chem.* 11: 372-375.

GHOSH P., SIL P., THAKUR J. (1987). Spray reagent for the detection of coumarins and flavonoids in thin-layer plates. *J. Chromatogr.* 403: 285-287.

GIL-ALBERDI E. (1987). Estudio analítico de flavonas y sus trimetilsilil derivados por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Tesina de Licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid.

GILDEMEISTER E., HOFFMANN FR. (1961). Die aetherischen oele. 4ª Ed. Vol. VI. Akademik Verlag. Berlín.

GOMEZ-CORDOVES C. (1993). Comunicación personal.

GOMEZ-CORDOVES C., GARRIDO J. L., DIEZ C. (1978). Etude des composés phenoliques des eaux-de-vie vieilles en bois de chene. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols* 8: 369-373.

GONZALEZ M. L., PEREZ-ILZARBE F. J. (1990). Ventajas del Sep-Pak sobre la cromatografía en columna en la separación de compuestos fenólicos de *R. simsii*. *Cromatografía y Técnicas Afines* 11(2): 83-85.

GOODMAN R. N., KIRALY Z., WOOD K. R. (1986). Biochemistry and Physiology of Plant Disease. University of Missouri Press. Columbia MO. p. 374-375.

GOTTLIEB O. R. (1975). En J. B. Harborne, T. J. Mabry, H. Mabry (Ed.) *The flavonoids*. Chapman and Hall. London. p. 269-375.

GRAYER R. J. (1989). Flavanoids. En P. M. Dey y J. B. Harborne (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 1. *Plant Phenolics*. Academic Press. New York. p. 283.

GRISEBACH H. (1957). The biogenesis of cyanidins I. Experiments with acetate-1-C<sup>14</sup> and acetate-2-C<sup>14</sup>. *Z. Natursf.* 12b: 227-231.

GROSS G. G. (1981). En P. K. Stumpf y E. E. Conn (Ed.). *Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*. Vol. 7. Academic Press. London and New York. p. 301-316.



GROSS G. G. (1985). En T. Higuchi (Ed.). *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Academic Press. New York. p. 229-271.

GRUNDSCHOBER F., PREY V. (1961). Sodium succinate. *Monatsh. Chem.* 92: 1290-1293.

GUENTHER E. (1965). The essential oils. 4<sup>a</sup> Ed. Vol. IV. Van Nostrand Company. Nueva York.

HASLAM E. (1982). Proanthocyanidins. En J. B. Harborne y T. J. Mabry (Ed.). *The flavonoids. Advances in research*. Chapman and Hall. New York.

HARBORNE J. B. (1967). Comparative Biochemistry of Flavonoids. Academic Press. New York.

HARBORNE J. B. (1975). Flavonoids sulphates: a new class of sulphur compounds in higher plants. *Phytochem.* 14, 1147-1155.

HARBORNE J. B. (1975). En J. B. Harborne, T. J. Mabry y H. Mabry (Ed.). *The flavonoids*. Chapman and Hall. London. p. 1056-1095.

HARBORNE J. B. (1976). En T. W. Goldwin (Ed.). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. 2<sup>a</sup> Ed. Vol. 1. Academic Press. New York. p. 736.

HARBORNE J. B. (1985). Current trends in the chromatographic analysis of plant phenolics. *Adv. Med. Plant. Res. Plenary Lect. Int. Cong. 32nd. 1984. (Publ. 1985).* p. 135-151.

HARBORNE J. B. (1988). The flavonoids. Advances in research since 1980. Chapman and Hall. London.

HARBORNE J. B. (1989). General Procedures and Measurement of total Phenolics. En P. M. Dey y J. B. Harborne (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1. Plant Phenolics*. Academic Press. p. 1-28.

HARBORNE J. B., BOARDLEY M., LINDER H. P. (1985). Variations in flavonoid patterns within the genus *Chondropetalum* (Restionaceae). *Phytochem.* 24(2): 273-278.

HARBORNE J. B., GRAYER R. J. (1988). The anthocyanidins. En J. B. Harborne (Ed.). *The flavonoids: Advances in research since 1980*. Chapman and Hall. London. p. 1718.

HARBORNE J. B., SIMMONDS N. W. (1964). *Biochemistry of phenolic compounds*. Academic Press. New York.

HARBORNE J. B., WILLIAMS C. A. (1982). En J. B. Harborne y T. J. Mabry (Ed.). *The flavonoids: Advances in research*. Chapman and Hall. London. p. 261-311.

HARBORNE J. B., WILLIAMS C. A. (1988). En J. B. Harborne (Ed.). *The flavonoids: Advances in research since 1980*. Chapman and Hall. London. p. 303-328.

HASLAM E., LILEY T. H. (1985). En C. F. Van Sumere y P. J. Lea (Ed.). *Biochemistry of Plant Phenolics*. Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Vol. 25. Clarendon Press. Oxford. p. 237-256.

HASLER A., STICHER O., MEIER B. (1990). HPLC determination of five widespread flavonoid aglycones. *J. Chromatogr.* 508(1): 236-240.

HAYASE F., KATO H. (1984). Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 30(1): 37-46. (Ref. LARSON, 1988).

HEIMLER D. (1986). High-performance liquid chromatography of selected flavonoids aglycones on ready-for-use layers of silanized silica gel. *J. Chromatogr.* 366: 407-411.

HEIMLER D., MITTENPERGHER L., BUZZINI P., BODDI V. (1990). Quantitative HPTLC separation of flavonoid glycosides in the taxonomy of Elm (*Ulmus* spp.). *Chromatographia* 29: 16-20.

HELLER W., FORKMANN G. (1988). Biosynthesis. En J. B. Harborne (Ed.). *The flavonoids: Advances in research since 1980*. Chapman and Hall. London. p. 399-425.

HERGERT H. L. (1962). En T. A. Geismann (Ed.) *The chemistry of flavonoid compounds*. Mac. Millan Co. New York. p. 553.

HERNANDEZ T., SANCHEZ E. (1980). La separation des phénols non flavonoides par la CLHP. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols* 10: 263-268.

HEYWOOD V. H. (1985). Las plantas con flores. Editorial Reverté S. A. Barcelona. p. 157.

HICKS K. B., SONDEY S.M., HARGRAVE D., SAPERS G. M., BILYK A. (1985). Automated preparative HPLC of anthocyanins. *LC Mag.* 3(11): 981-982.

HILLIS W. E. (1952). Eucalypt kinos. II. Aromadendrin, kaempferol and ellagic acid. *Aust. J. Sci. Res. Ser. A.* 5: 379-385.

HILLIS W. E. (1962). Wood extractives and their significance to the Pulp and Paper Industries. Academic Press. p. 381.

HILLIS W. E. (1966). Variation of polyphenol composition within species of *Eucalyptus*. *Phytochem.* 5(4): 541-556.

HILLIS W. E., CARLE A. (1960). The chemistry of eucalypt kinos. III. (+)-Afzelechin, pyrogallol and (+)-catechin from *Eucalyptus calophylla* kino. *Aust. J. Chem.* 13: 390-392.

HILLIS W. E., CARLE A. (1963). Chemistry of eucalypt kinos. IV: *Eucalyptus hemiphloia* kino. *Aust. J. Chem.* 16: 147-159.

HILLIS W. E., HART J. H., YAZAKI Y. (1974). Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon* wood. *Phytochem.* 13(8): 1591-1595.

HILLIS W. E., HINGSTON F. J. (1963). Polyphenols in the leaves of some *Eucalyptus* species. *J. Sci. Food Agric.* 14: 866-870.

HILLIS W. E., ISOI K. (1965). Variation in the chemical composition of *Eucalyptus sideroxylon*. *Phytochem.* 4: 541-550.

HORN, D. H. S., KRANZ Z. H., LAMBERTON J. A. (1964). Composition of *Eucalyptus* and some other leaf waxes. *Aust. J. Chem.* 17(4): 464-476.

HOROWITZ R. M. (1986). Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Alan R. Liss. New York. p. 163-175.

HOSTETTMANN K., DOMON B., SCHAUFELBERGER D., HOSTETTMANN M. (1984). On-line high-performance liquid chromatography ultraviolet-visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post-column derivatization. *J. Chromatogr.* 283: 137-147.

HOSTETTMANN K., MARSTON A. (1986). Isolation, purification and characterization of flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* 213 (Plant Flavonoids Biol. Med.): 43-51.

HSU S. I., ELKERLIN R. H., HENION J. D. (1988). Identification and quantification of trembolone in bovine tissue by gas-chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 424: 219-229.

HUSAIN S. R., CILLARD J., CILLARD P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem.* 26: 2489-2491.

IBRAHIM R., BARRON D. (1989). Phenylpropanoids. En P. D. Dey y J. B. Harborne (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1. Plant Phenolics.* P. 75-110.

ICKES G. R., FONG H. H. S., SCHIFF P. L. Jr., PERDUE R. E. Jr., FANSWORTH N. R. (1973). Antitumor activity and preliminary phytochemical examination of *Tagetes minuta* (Compositae). *J. Pharm. Sci.* 62: 1009-1011.

INGLE H. D., DADSWELL H. E. (1953). The anatomy of the timbers of the South-West Pacific area. III. *Myrtaceae.* *Aust. J. Bot.*, 1: 353-400.

ISHERWOOD F. A., JERMYN M. A. (1951). Relationship between the structure of the simple sugars and the behaviour on the paper chromatogram. *Biochem. J.* 48: 515-524.

ISHIKURA N., SATO S., KUROSAWA K. (1976). Kaempferol-3-rhamnosylxyloside from *Euonymus alatus*. *Phytochem.* 15: 1183.

JACOBS M., RUBERY P. H. (1988). Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241: 346-349.

JANGAARD N. O. (1970). Thin-layer chromatography on some plant phenolics. *J. Chromatogr.* 50: 146-148.

JAWORSKI A. W., LEE C. Y. (1987). Fractionation and HPLC determination of grape phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 35: 257.

JERUMANIS J. (1985). Quantitative analysis of flavonoids in barley, hops and beer by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Inst. Brew.* 91(4): 250-252.

JOHANSON R. (1953). New specific reagent for keto sugars. *Nature* 172: 956-957.

JUDEZ L. (1989). Técnicas de Análisis de datos multidimensionales. Ed. Secret. Gral. Técnica. MAPA. Madrid.

JULKUNEN-TUTTO R., TAHVANIANEN J. (1989). The effect of the sample preparation method of extractable phenolics of *Salicaceae* species. *Planta Medica* 55: 55-58.

JURD L., GEISMANN T. A. (1956). Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. *J. Org. Chem.* 21: 1395-1401.

KARPPA J., KALLIO H., PELTONEN I., LINKO R. (1984). *J. Sci. Food Agric.* 49: 634. (Ref. DAIGLE y CONKERTON, 1988).

KATSURA E., YAMAGISHI T. (1982). Quantitative determination of flavonoids in *Scutellaria radix* by high-performance liquid chromatography. *Hokkaido Eisei Kenkyuhoho* 32: 17-20.

KAWAHARA F. K. (1968). Microdetermination of derivatives of phenols and mercaptans by means of electron capture gas chromatography. *Anal. Chem.* 40(6): 1009-1010.

KHALID S. A., FARUK A., GEARY T. G., JENSEN J. B. (1986). Potential antimalarial candidates from African plants: an in vitro approach using *Plasmodium falciparum*. *J. Ethnopharmacol.* 15(2): 201-209.

KHETWAL K. S., MANRAL K., VERMA R. L. (1988). Flavonoids from the roots of *Sedum cressipes*. *Planta Medica* 54(1): 89-90.

KIMURA Y., OKUDA H., NISHIBI S., ARICHI S. (1987). Effects of caffeoylglycosides on arachidonate metabolism in leukocytes. *Planta Medica* 148-153.

KIRCHNER J. G. (1978). Thin-Layer Chromatography. En A. Weisberger (Ed.). *Techniques of chemistry*. J. Willey and Sons. New York.

KITADA Y., MIZOBUCHI M., UEDA Y. (1985). Analysis of isoflavones in *Puerariae radix* by high-performance liquid chromatographic with amperometric detection. *J. Chromatogr.* 347: 438-442.

KITAGAWA S., TSUKAMOTO H., HISADA S., NISHIBE S. (1984). Studies on the Chinese crude drug "*forsythiae fructus*". VII. A new caffeoyl glycoside from *Forsythia viridissima*. *Chem. Pharm. Bull.* 32(3): 1209-1213.

KLEBE J. F., FINKBEINER H., WHITE D. M. (1966). Silylation with *bis*-(trimethylsilyl)acetamide, a highly reactive silyl donor. *J. Am. Chem. Soc.* 88: 3390-3395.

KLOK J., NIEBERG-VAN VELZEN E. H., LEEUW J. W., SCHENKP. A. (1981). Capillary gas chromatographic separation of monosaccharides as their alditol acetals. *J. Chromatogr.* 207: 273-275.

KNAPP D. R. (1979). Handbook of Analytical Derivatization Reactions. John Wiley and Sons. New York.

KOCHS G., GRISEBACH H. (1986). Enzymic synthesis of isoflavones. *Eur. J. Biochem.* 155(2): 311-318.

KRISTIANSEN K. N. (1986). *Carlberg Res. Commun.* 51: 51. (Ref. HELLER Y FORKMANN, 1986).

KUBITZKI K. (1987). Phenylpropanoid metabolism in relation to land plant origin and diversification. *J. Plant Physiol.* 131: 17-24.

LACKEMAN G. M., CLAEYS M., RWANGABO P. G., HERMAN A. G., VLEIETINK A. J. (1986). *Planta Medica* 52: 433. (Ref. PATHAK *et al.*, 1991).

LAKS P. E., PRUNER M. S. (1989). Flavonoid biocides: structure/activity of flavonoid phytoalexin analogues. *Phytochem.* 28(1): 87-91.

LAMBERTON J. A. (1964). The occurrence of 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-6-metilflavone in *Eucalyptus* waxes. *Aust. J. Chem.* 17(6): 692-696.

LARSON R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochem.* 27(4): 969-978.

LAU-CAM C. A., CHAN H. H. (1973). Flavonoids of *Myricaceae*. I. Flavonoids from *Comptonia peregrina*. *Phytochem.* 12(7): 1829.

LAW K. H., DAS N. P. (1987). Dual-wavelength absorbance ratio and spectrum scanning techniques for identification of flavonoids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 388: 225-283.

LEA A. G. H., BRIDDLE P., TIMBERLAKE C. F., SINGLETON V. L. (1979). The proanthocyanidins of white grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 30: 289-300.

LIN Y., CHEN F., LEE Y. (1989). Hinokiflavone, a cytotoxic principle from *Rhus succedanea* and the cytotoxicity of the related biflavonoids. *Planta Medica* 55: 166-168.

LOWENSTEIN J. M. (1981). *Methods Enzymol.* Vol. 71. p. 5.

LUNTE S. (1987). Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultraviolet-visible and electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 384: 371-382.



LYUBANSKII B. F., TALMUD S. L., KOGAN V. B. (1981). Effects of surfactants in the extraction of larchwood in pulsating-rotary apparatus. *Zh. Prikl. Khim.* 54(7): 1630-1632.

MABRY T. J., MARKHAM K. R., THOMAS M. B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag. New York.

MABRY T. J., ULUBELEN A. (1980). Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.* 28: 188-196.

MALTERUD K. E.; BREMNES T. C., FAEGRI A., MOE T., SANDANGER DUGSTA E. V. (1985). Flavonoids from the wood of *Salix caprea* as inhibitors of wood-destroying fungi. *J. Nat. Prod.* 48(4): 559-563.

MARGHIERI G. (1980). Importance de la connaissance des composés polyphénoliques des vins rouges pour l'amélioration de la qualité. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols* 9: 62-71.

MARINI BETTOLO G., PAOLETTI A., NICOLETTI M. (1981). Determination of components of exotic wood powders. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 17(2): 189-98.

MARIGO G. (1973). Method for the fractionation and estimation of plant phenolics compounds. *Analusis* 2(2): 106-110.

MARKHAM K. R. (1975). En J. B. Harborne, T. J. Mabry y H. Mabry (Ed.). *The flavonoids*. Chapman and Hall. London. p. 1.

MARKHAM K. R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Academic Press. London.

MARKHAM K. R. (1988). En J. B. Harborne (Ed.). *The flavonoids: Advances in research since 1980*. Chapman and Hall. London. p. 427-468.

MARKHAM K. R. (1989). Flavones, flavonols and their glycosides. En P. M. Dey y J. B. Harborne (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 1. *Plant Phenolics*. Academic Press. London. p. 197-235.

MARKHAM K. R., FRANKE A., MOLLOY, B. P. J. (1990). Flavonoid profiles of New Zealand *Libocedrus* and related genera. *Phytochem.* 29: 501-507.

MARTINEZ F. (1980). Contribución al estudio fitoquímico y quimiotaxónomico del género *Thymus* L. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.

MARTINEZ-CASTRO I., PAEZ M. I., SANZ J., GARCIA-RASO A. (1989). Gas chromatographic behaviour of carbohydrate trimethylsilyl ethers. *J. Chromatogr.* 462: 49-60.

MARUHENDA E., ALARCON DE CASTRA C. (1987). Flavones isolated from *Thymus carnosus* Boise. *Ann. Pharm. Fr.* 45: 467.

MATERN U., KNEUSEL R. E. (1988). Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica* 16: 213-226.

MAZZA G. (1986). Anthocyanins and other phenolic compounds of saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). *J. Food Sci.* 51: 1260-1264.

McCLURE J. W. (1979). En T. Swain, J. B. Harborne y C. F. Van Sumere (Ed.). *Biochemistry of Plant Phenolics*. Plenum Press. New York. p. 525.

McDOUGAL K. M., PARKS C. R. (1984). Elevational variation in foliar flavonoids of *Quercus rubra* L. (Fagaceae) (in the Appalacchian Mountain of North Carolina and Georgia). *Am. J. Botany* 71: 301.

McLEAN E., GARDNER J. A. (1953). *Pulp and Paper Mags. of Canada* 54: 123.

McMURROUGH I. (1981). High performance liquid chromatography of flavonoid in barley and hops. *J. Chromatogr.* 218: 683-693.

McMURROUGH I., HENNIGAN G. P., LOUGHREY M. J. (1982). *J. Agric. Food Chem.* 30: 1102. (Ref. DAIGLE y CONKERTON, 1988).

METCALF L. D., SCHMITZ A. A. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38: 514.

MIDDLETON E., DRZEWIECKI G. (1982). Effects of flavonoids and transitional metal cations on antigen-induced histamine release from human basophils. *Biochem. Pharmacol.* 31(7): 1499-1453.

MISHRA C. S., MISRA K. (1980). Chemical examination of the stem bark of *Eucalyptus maculata*. *Planta Medica* 38(2): 169-173.

MOOKERJEE B. K., LEE T. P., LOGUE G. P., LIPPES H. A., MIDDLETON E. (1986). The effects of flavonoids in human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biol. Res.* 213: 511-520.

MORIMOTO S., NONAKA G., NISHIOKA I. (1986). Tannins and related compounds. XXXVIII. Isolation and characterization of flavan-3-ol glucosides and procyanidin oligomers from cassia bark (*Cinamomum cassia* Blume). *Chem. Pharm. Bull.* 34(2): 633-642.

MOUSTAFA S. M. I., ATTIA I. A., HASSAN N. A. (1984). Determination of flavonoids. *Fitoterapia* 55(5): 295-296.

MUCSI I. (1985). Virus inactivating and virus reproduction-inhibiting activities of flavonoids. *Kiesed. Orvostud.* 37: 442.

- MUELLER-HARVEY I., REED J., HARTLEY R. D. (1987). Characterization of phenolic compounds, including flavonoids and tannins of ten Ethiopian browse species by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 39(1): 1-14.
- MUES R. (1988). Methods in Bryology. En J. M. Glime (Ed.). *Proc. Bryol. Meth. Workshop, Mainz.* p. 147-156.
- NAGAWA M. A., SAHAR Y. A. (1988). *Arch. Pharm. Res.* 11: 166. (Ref. PATHAK *et al.*, 1991).
- NAGEL C. W. (1985). Application of high-performance liquid chromatography to analysis of flavonoids and phenylpropanoids. *Cereal Chem.* 62(5): 144-147.
- NEU P. (1957). Ein neues reagentz zum Nachweiss und zur Underrcheidung von flavonem in papierchromatogramm. *Naturwissenschaften* 44: 181.
- New Trends Ther. Liver Dis. Proc. Int. Symp. (1974). A. Bertelli (Ed.). Karger. Basel. Switzerland.
- NICHOLLS K. W., BOHM B. A. (1982). Quantitative flavonoid variation in *Lupinus sericeus*. *Biochem. system. ecol.* 10(3): 225-231.
- NICHOLSON R. L., HAMMERSCHMIDT R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 369-389.
- NIKAIDO T., OHMOTO T., SAUKAWA U., TOMIMORI T., MIYAICHI Y., IMOTO V. (1988). Inhibitors of c-AMP phosphodiesterase in medicinal plants. Part XIII. Inhibition of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 654-651.

NISHINO C., ENOKI N., TANATA S., MORI A., KOBAYASHI K., FUKUSHIMA M. (1987). Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermis*, a skin bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 51(1): 139-143.

NORO T., ODA Y., MIYASE T., UENO A., FUKUSHIMA S. (1983). Studies of enzyme inhibitors. II. Inhibitors of xanthine oxidase from flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem. Pharm. Bull.* 31(11): 3984-3987.

OLLIS W. D. (1962). En T. A. Geisman (Ed.). *The Chemistry of flavonoid compounds*. Pergamon Press. Oxford.

OKAMURA H., MIMURA A., NIWANO M., TAKAHARA Y., YASUDA H., YOSHIDA H. (1993). Two acylated flavonol glycosides from *Eucalyptus rostrata*. *Phytochem.* 33(2): 512-514.

OKSUZ S., HALFON B., TEREM B. (1988). Flavonoids from *Centaurea cuneifolia*. *Planta Medica* 54(1): 89.

OKUDA J., MIWA I., INAGAKI K., HORI T., NAKAYAMA M. (1984). Inhibition of aldose reductase by 3',4'-dihydroxiflavones. *Chem. Pharm. Bull.* 32(2): 767-772.

OSAWA T., NAMIKI M. (1985). Natural antioxidants isolated from *Eucalyptus* leaf waxes. *J. Agric. Food Chem.* 33: 773-780.

OSHIMA R., KUMANOTANI J., WATANABE L. (1983). Gas-chromatographic resolution of sugar enantiomers as diastereoisomers methylbenzylaminoalдитols. *J. Chromatogr.* 259(1): 159-163.

OSWALD W.F. (1985). *J. Chromatogr.* 333. 225. (Ref. DAIGLE y CONKETON, 1988).

OSZMIANSKI J. (1984). Influence of apple pulp browning on polyphenols and on juice colour. *Bull. Liaison Groupes Polyphenols* 12: 465-469.

OSZMIANSKI J., RAMON J., BOURZIEUX M. (1988). Fractionation of phenolic compounds in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 39(3): 259-262.

PACHECO H. (1957). *Bull. Soc. Chim. Biol.* 39: 971. (Ref. RIBEREAU-GAYON, 1968).

PARAJO J. C., ANTORRENA G., VAZQUEZ G. (1983). Hacia un aprovechamiento integral de la corteza del pino. *Ingeniería Química Nov.*: 173-181.

PARK G. L., AVERY S. M., BYERS J. L., NELSON D. B. (1983). Identification of bioflavonoids from citrus. *Food Technol.* 37(12): 98-105.

PATRON N., SMITH P., MABRY J. (1985). Identification of flavonoids compounds in HPLC separation of sugar cane colorants. *Int. Sugar J.* 87(1043): 213-215.

PATHAK D., PATHAK A. K., SINGLA A. K. (1991). Flavonoids as medicinal agents. Recent advances. *Fitoterapia* LXII(5): 371-401.

PEARL I. A. (1958). Hardwood extractives and their relation to other wood components. *Tappi*, 41: 621-624.

PENFOLD A. R., WILLIS, J. L. (1961). The Eucalypts. Botany, cultivation and utilization. Leonard Hill. London.

PEREIRA H. (1988). Variability in the chemical composition of plantation eucalypts (*Eucalyptus globulus* Labill.). *Wood and Fiber Science* 20(1): 82-90.

PESCHKE N. (1965). *J. Chromatogr.* 20: 572.

PETRONICI C., SAFINA G. (1953). The technique of chromatographic analysis in particular the analysis by paper chromatography of the amino acids and simple sugars. *Conserve e deriv. agrumar.* 2(5): 3-11.

PIERCE A. E. (1968). Silylation of Organic Compounds. Pierce Chemicals. Rockford, IL.

PIERCE A. E. (1993). GC-Derivatization. Pierce Chemicals Company. Rockford, IL.

PIETTA D., CALATRONI A., ZIO C. (1983). High performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from *Ononis spinosa* L. *J. Chromatogr.* 280(1): 172-5.

PORTER L. (1988). Flavans and Proanthocyanidins. En J. B. Harborne (Ed.). *The flavonoids: Advances in research since 1980.* Chapman and Hall. London. p. 21-62.

POWELL P., HILDEBRAND C. (1970). Fire blight in resistance in virus: involvement of arbutin oxidation. *Phytopathology* 60(2): 337-340.

POLLUNIN O. (1977). Guía de campo de las flores de Europa. Ed. Omega. Barcelona.

PRATT D. E. (1976). En G. Charalambous y I. Katz (Ed.). *Phenolic, Sulfur and Nitrogen Compounds in Food Flavours.* Amer. Chem. Soc. Sympos. Ser. Vol. 26. Washington DC. p. 1.

PREY V., BERBACK H., KAUSZ M. (1962). Paper chromatography of organic substances. VII. The thin layer chromatography of several carbohydrates derivatives and degradation products. *Mikrochim. Acta* 449-454.

RADFORD T., DE JONGH D. C. (1972). En G. R. Waller (Ed.). *Biomedical Applications of Mass Spectrometry*. Wiley Interscience, New York. p. 313.

RANDERATH K. (1962). *Dunnschicht Chromatographie*. Neunter Teil. Phenole und phenolische Naturstoffe. Verlag Chemie, GmbH. Weinheim. p. 178.

RANDERATH K. (1965). *Cromatografía en capa fina*. Ed. Urmo. 2ª ed. Barcelona.

RENEDO OMAECHEVARRIA J., OTERO HERMIDA J. A., MIRA SOTO J. R. (1992). El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. en Cantabria. *Memoria de las I Jornadas Ibéricas de Plantas Medicinales, Aromáticas y de Aceites Esenciales*. Madrid, 1984. INIA-MAPA. p. 175-180.

REZNIK H., EGGER K. (1961). Benedicts reagens als indicator für phenolische ortho-dihydroxygruppen. *Zeit. Analyst. Chemie* 186: 407.

RIBEREAU-GAYON P. (1968). *Les composés phenoliques des vegetaux*. Dunod. Paris.

RIBEREAU-GAYON P. (1976). Les problemes de la couleur des vins rouges. *Semana Internacional del Vino*. Jerez de la Frontera.

RIBEREAU-GAYON P. (1982). En P. Markakis (Ed.). *Anthocyanins as Food Colours*. Academic Press. New York. p. 209-244.

ROBBERECHT R., CALDWELL M. M. (1978). Leaf epidermal transmittance of ultraviolet radiation and its implications for plant sensitivity to ultraviolet radiation induced injury. *Oecologia* 32: 277-287.



RUIZ DE LA TORRE J. (1979). Arboles y arbustos de la España Peninsular. Publicaciones de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de Madrid.

RUSZNYAK S., SZENT-GYORGYI A. (1936). *Nature* 138: 27. (Ref. MABRY y ULUBELEN, 1986).

RWANGABO P. C., CLAEYS M., PIETERS L. (1988). Umuhengerin, a new antimicrobially active flavonoid from *Lantana trifolia*. *J. Nat. Products* 51: 966-968.

SACHSE J. (1984). Quantitative hochdruckflüssigchromatographie von isoflavonem in Rotkläe (*Trifolium pratense* L.). *J. Chromatogr.* 298: 175-182.

SACHSE J. (1988). Gelbe flecken in der kartoffelsorte "Hertha". *J. Lebensm. Unters. Forsch.* 186: 407-411.

SALEH N. A. M., MANSOUR R. M. A., EL-KAREEMY Z. A. R. (1988). The chemosystematics of local members of the subtribe *Guaphaliinae* (*Compositae*). *Biochem. system. ecol.* 16: 615-617.

SAKUSHIMA A., NISHIBE S. (1988). Mass spectrometry in the structural determination of flavonol tryglycosides from *Vinca major*. *Phytochem.* 27(3): 915-919.

SAMBANATHAN P. T., VISWANATHAN S., REDDY M. K., RAMACHANDRAN S., KAMESWARAN L. (1985). *Indian J. Pharm. Sci.* 47, 230. (Ref. PATHAK et al., 1991).

SATWALEKAR S. S., GUPTA T. R., RAO P. L. N. (1957). Chemical and antibacterial properties of kinos from *Eucalypts* spp. citriodorol-the antiobiotic principle from the kino of *E. citriodora*. *J. Indian Inst. Sci.* 39: 195-212.

SCHAUFELBERGER D., HOSTETTMANN K. (1987). High-performance liquid analysis of secoiridoid and flavone glycosides in closely related *Gentiana* species. *J. Chromatogr.* 389: 450-455.

SCHAUFELBERGER D., HOSTETTMANN K. (1988). Chemistry and pharmacology of *Gentiana lactea*. *Planta Medica* 219-221.

SCHILLING E. E., PANERO J. L. (1988). Flavonoids of *Viguiera* Section *Maculatae*. *Biochem. system. ecol.* 16(4): 417-418.

SCHMID P. P. S. (1978). Quantitative analyse von flavonoiden auf dünnschicht-platten. *J. Chromatogr.* 157: 217-225.

SCHRAM A. W., JONSSON L. M. V., DE VLAMING P. (1983). Identification of anthocyanins and intermediates of anthocyanin biosynthesis from *Petunia hybrida* using high-performance liquid chromatography. *Z. Natursforsch. C. Biosci.* 38c(5-6): 342-345.

SCHWARTZ A., MIDDLETON E. Jr. (1984). Comparison of the effects of quercetin with those of other flavonoids on the generation and effector function of cytotoxic T lymphocytes. *Inmunopharmacology* 72: 115-126.

SENDRA J. M., NAVARRO J. L., IZQUIERDO L. (1988). C<sub>18</sub>-solid-phase isolation and high-performance liquid chromatography / ultraviolet diode array determination of fully methoxilated flavones in citrus juices. *J. Chromatogr. Sci.* 26(9): 443-448.

SEO A., MORR C. V. (1984). Improved high-performance liquid chromatography analysis of phenolic acids and isoflavonoids from soybean protein products. *J. Agric. Food Chem.* 32(3): 830-833.

SHARMA P. J., CROWDEN R. K. (1974). Anthocyanins in some *Eucalyptus* species. *Aust. J. Bot.* 22(3): 623-627.

SHIN K. H., KIM H. Y., WOO W. S. (1982). Determination of flavonoids in seeds of *Zizyphus vulgaris* var. *spinosus* by high performance liquid chromatography. *Planta Medica* 44(2): 94-96.

SIEWEK F., GALENSA R., HIERMANN K. (1985). Detection of adulteration of grape juice and of alcoholic beverages prepared from grape juice with fig juice by determination of flavone C-glycosides using HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 181(5): 391-394.

SINGH U. P., PANDEY V. B., SINGH K. N., SINGH R. D. N. (1988). Antifungal activity of some new flavones and flavone glycosides of *Echinops echinatus*. *Can. J. Bot.* 66: 1901-1908.

SINGH B., SINHA G. K. (1981). Chemical study of the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* raised in Tarai region of Kumaon (Uttar Pradesh). *PAFAI J.* 3(1): 20-21.

SINGLETON V. L., ROSSI J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.

SINGLETON V. L., TROUSDALE E. (1983). White wine phenolics: varietal and differences as shown by HPLC. *Am. J. Enol. Vitic.* 34: 27.

SPIEGEL M. R. (1991). Estadística. 2ª ed. Mc. Graw Hill. New York.

SRINIVASAN S., LUCAS T., BURROWES C. B., WANDERMAN N. A., REDNER A., BERNSTEIN S., SAWYER P. N. (1971). Effects of some flavonoids on the surface charge characteristics of the vascular system and their antithrombogenic characteristics. *Eur. Conf. Microcir.* 6: 394-398.

STAFFORD H. A. (1991). Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiol.* 96: 680-685.

STAFFORD H. A., LESTER H. H. (1982). Enzymic and non enzymic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4-diol. *Plant Physiol.* 70(3): 695-698.

STAHL E. (1969). TLC: A Laboratory Handbook. Springer-Verlag. 2<sup>a</sup> Ed. Berlin.

STAHL E., KALTENBACH V. (1961). Dünnschicht-chromatographie. VI. Mitteilung, spurenanalyse von zuckergemischen auf lieselgur G-schichtne. *J. Chromatogr.* 5: 351-355.

STEWART C. M. (1969). *Appita* 22(4): XXXIII.

STOESSEL P. (1985). Structure-activity relationship of some bean phytoalexins and related isoflavonoids. *Physiol. Plant Pathol.* 26(3): 269-277.

STOZT G., FORKMANN G. (1982). *Z. Natursforsch.* 37c: 19. (Ref. HELLER y FORKMANN, 1986).

STRACK D. (1978). Reverse-phase HPLC separation of naturally occurring mixtures of flavone derivatives. *J. Chromatogr.* 156: 359-361.

SULLIVAN J. E., SCHEWE L. R. (1977). Preparation and gas chromatography of highly volatiletrifluoroacetylated carbohydrates using N-methyl-bis(trifluoroacetamide). *J. Chromatogr. Sci.* 15: 196-197.

SULSER H. (1957). *Mitt. Gebiete Lebnsn. Hyg.* 48: 19. (Ref. RANDERATH, 1965).

SURICO G., VARVARO L., SOLFRIZZO M. (1987). Linear furocoumarin accumulation in celery plants infected with *Erwinia carotovora* pv. *caratovora*. *J. Agric. Food Sci.* 35: 406-409.

SWEELEY C. C., BENTLEY R., MAKITA M., WELLS W. W. (1963). Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2497-2507.

TAKAGI T., IIDA T. (1980). Antioxidant for fats and oils from canary seed: sterol and triterpene alcohol esters of caffeic acid. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 57: 326-330.

TAKAHAMA U. (1985). *Phytochem.* 24: 1443. (Ref. PATHAK et al., 1991).

TAKEDA T., ISHIGURO I., HASEGI M., OGIHARA Y. (1977). New isoflavone glycosides from the woods of *Sophora japonica*. *Phytochem.* 16: 620-621.

TER BRAAK C. J. F. (1987). Canoco: A Fortran Program for Canonical Community Ordination. Wageningen.

TIMBERLAKE C. F., HENRY B. S. (1986). Plant pigments as natural food colors. *Endeavour* (New Ser.) 10(1): 31-36.

TOMAS-BARBERAN F. A., GRAYER-BARKMEISTER R. J., GIL M. I., HARBORNE J. B. (1988). Distribution of 6-hidroxy, 6-methoxy and 8-hydroxi flavone glycosides in the *Labiatae*, the *Scrophulariaceae* and related families. *Phytochem.* 27(8): 2631-2645.

TOMAS-BARBERAN F., HUSSAIN S. Z., GIL M. I. (1988). The distribution of methylated flavones in the *Lamiaceae*. *Biochem. system. ecol.* 16: 43-46.

TOMAS-LORENTE F. (1991). Comunicación personal.

TOMAS-LORENTE F., GARCIA-GRAU M., TOMAS-BARBERAN F. (1988). The wastes of the industrial treatment of *Salvia lavandulaefolia* as a source of biologically active flavonoids. *Fitoterapia* 59(1): 62-64.

TOMIMORI T., HIYAICHI Y., IMOTO Y., KIZU H. (1984). Studies on the constituents of *Scutellaria* species. II. On the flavonoid constituents of "Ban Zhi Lian", the whole herb of *Scutellaria rivularis* wall. *Shoyakugaku Zashi* 38(3): 249-252.

TOREL J., CILLARD J., CILLARD P. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and other simple phenolics in vascular plants. *Phytochem.* 25: 383.

TOUCHSTONE J. C., DOBBINS M. E. (1978). Practice of Thin-Layer Chromatography. John Wiley and Sons. New York.

TUBARO A., DEL NEGRO P., BIANCHI P., ROMUSSI G., DELLA LOGGIA R. (1989). Topical antiinflammatory activity of a new acilated flavonoid. *Agents and Actions* 26(1/2): 229-230.

TSUCHIYA Y., SHIMIZU M., HIYAMA Y., ITOH K., HASHIMOTO Y., NAKAYAMA M., HORIE T., MORITA N. (1985). Antiviral activity of natural occurring flavonoids in vitro. *Chem. Pharm. Bull.* 33(9): 3881-3886.

UBEDA A., VILLAR A. (1989). Relaxant actions of khellin on vascular smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 236-241.

VAN GENDEREN H. H., VAN BREDERODE J., NIEMANN G. J. (1983). Unexpected specificity of iodine - potassium iodide spray reagent for closely related flavones. *J. Chromatogr.* 256(1): 151-153.

VAN SUMERE C. F. (1989). Phenols and Phenolic Acids. En P. M. Dey y J. B. Harborne (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1. Plant Phenolics.* Academic Press. London. p. 29-73.

VAN SUMERE C. F., VANDE CASTEELE K., DELOOSE R., HEURSAL J. (1985). En C. F. Van Sumere y P. J. Lea (Ed.). *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Vol 25.* Clarendon Press. Oxford. p. 17-43.

VANDE CASTEELE K., GEIGER H., VAN SUMERE C. F. (1982). Separation of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 240(1): 81-94.

VAZQUEZ G., ANTORRENA G., PARAJO J. C. (1986). Selection of operational conditions in alkaline lixiviation of *Pinus pinaster* bark. *Holz als Roh-und Werkstoff* 44: 415-418.

VERCRUYSSSE S. A. R., DELCOUR J. A., DONDEYNE P. (1985). Isolation of quercetin, myricetin and their respective dihydro-compounds by Sephadex LH-20 chromatography. *J. Chromatogr.* 324(2): 495-497.

VILLECHNOUSE M., SANTAMARIA G., GOMEZ-CORDOVES C., ESTRELLA M. I., DIEZ C. (1976). Reunión Anual del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines.

VOGLE G. (1977). En H. Wagner y D. Wolff (Ed.) *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacologica, Biological and Therapeutical Activity*. Springer-Verlag. New York. p. 249.

VON RUDLOFF E. (1969). Recent advances in Phytochemistry. En M. K. Seikel y V. C. Runeikles (Ed.). *Proceedings of the seventh annual symposium of North America* 2. North-Holland Publishing Company. p. 107-162.

VRATNY P., BRINKMAN V. A., FREI R. W. (1985). Comparative study of post-column reactions for the detection of saccharides in liquid chromatography. *Anal. Chem.* 57(1): 224-229.

WEBBY R. F., MARKHAM K. R., MOLLOY B. P. J. (1987). The characterization of New Zealand *Podocarpus* hybrids using flavonoids markers. *N. Z. J. Bot.* 25: 355-366.

WEIDENBÖRNER M., HINDORF H., CHANDRA H., TSOTSONOS P., EGGE H. (1989). Antifungal activity of flavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. *Phytochem.* 28(12): 3317-3319.

WEIDENBÖRNER M., HINDORF H., JHA H. C., TSOTSONOS D. (1990). Antifungal activity of flavonoids against storage fungi of genus *Aspergillus*. *Phytochem.* 29(4): 1103-1105.

WEIDENBÖRNER M., HINDORF H., CHANDRA H., TSOTSONOS P., EGGE H. (1990)b. Antifungal activity of isoflavonoids in different reduced stages on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytochem.* 29(3): 801-807.

WEISSENBOCK G., SCHNABL H., SCHARF H., SACHS C. (1987). On the properties of fluorescing compounds in guard and epidermal cells of *Allium cepa* L. *Planta* 171: 88-95.

WELLS T. C., BOHM B. A. (1988). Flavonoids of *Luetkea pectinata* (*Rosaceae spiraeoideae*). *Biochem. system. ecol.* 16: 479-483.

WELTON A. F., TOBIAS L. D., FIEDLER N. C., ANDERSON N., HOPE W., MEYERS K., COFFEYS J. W. (1986). *Prog. Clin. Biol. Res.* 213: 231. (Ref. PATHAK et al., 1991).

WOLLENWEBER E. (1989). Dünnschicht-chromatographie von flavonoiden auf Polyamid-Schichten. *GIT Fachz-Lab. (Suppl. Chromatogr.)*. 50-54.

WOLLENWEBER E. (1990). 5-hidroxy-6,2'-dimetoxiflavone from *Primula denticulata*. *Phytochem.* 29(2): 633-637.

WOLLENWEBER E., DIETZ V. H. (1981). Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochem.* 20(5): 869-932.

WOLLENWEBER E., KOHORST G. (1981). Epicuticular leaf flavonoids from *Eucalyptus* species and from *Kalmia latifolia*. *Z. Naturforsch., C. Biosci.* 36c: 11-12.



WOO W. S., KANG S. K., SHIM S. H., WAGNER H., CHARI V. M., SELIGMANN O., OBERMEIR G. (1979). The structure of spinosin (2'-O- $\beta$ -glucosylswertisin) from *Zizyphus vulgaris* var. spinosus. *Phytochem.* 18: 353-355.

WULF L. W., NAGEL C. W. (1976). Analysis of phenolic acids and flavonoids by high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 116: 217-279.

YAGI K., OHISHI N. (1979). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 25: 127. (Ref. LARSON, 1988).

YATAGAI M., TAKAHASHI T. (1984). Essential oils and successive extractives of *Eucalyptus* leaves. *Biomass* 4(4): 305-310.

YAZAKI Y., HILLIS W. E. (1976). Polyphenols of *Eucalyptus globulus*, *E. regnans* and *E. deglupta*. *Phytochem.* 15(7): 1180-1182.

YOSHIMOTO T., FURKAWA M., VAMANO S., HORIE T., WATANABE S. K. (1983). Flavonoids potents inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 612-618.

YUTAKA E., USHIO S. (1985). *Chem. Pharm. Bull.* 33: 4091. (Ref. PATHAK et al., 1991).

ZHANG T., CAI D., ITO Y. (1988)a. Separations of flavonoids and alkaloids in medicinal herbs by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* 435(1): 159-166.

ZHANG T., XIAO R., PANWELL L. K., ITO Y. (1988)b. Rapid separation of flavonoids by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* 445(1): 199-206.

ZRIRA J. J., BENJILALI B. B. (1991). The essential oils of the leaves and fruits of *Eucalyptus camaldulensis*. *J. Ess. Oil Research* 3(6): 443-444.

## **APENDICES**

**APENDICE I. NOMENCLATURA I.U.P.A.C Y PROCEDENCIA COMERCIAL DE PATRONES.**

En este apartado se recoge la nomenclatura I.U.P.A.C de las estructuras correspondientes a los compuestos químicos descritos a lo largo del texto mediante su nombre vulgar. También se señala la procedencia de aquellos compuestos que han sido utilizados como patrones, indicando la Firma suministradora o, en algunos casos, el investigador que lo ha cedido.

Nomenclatura y procedencia de compuestos polifenólicos y reactivos.		
Compuesto (nombre vulgar)	Estructura	Procedencia
Acido anísico	Acido 4-metoxibenzoico	Fluka
Acido caféico	Acido 3-(3,4-dihidroxifenil), 2-propenoico. (Acido 3,4- dihidroxicinámico)	
Acido cinámico	Acido 3-fenil, 2-propenoico	
Acido clorogénico	Ac. 3-(3',4'-dihidroxicinamoil)- -1,4,5-trihidroxiciclohexan- carboxílico	Fluka
Ac. 2,4-dihidroxibenzoico	Acido 2,4-dihidroxibenzoico	Fluka
Ac. 2,6-dihidroxibenzoico	Acido 2,6-dihidroxibenzoico	
Ac. 3,5-dihidroxibenzoico	Acido 3,5-dihidroxibenzoico	
Acido 2,5- dihidroxifenilacético	Acido 2-(2,5-dihidroxifenil)- etanoico	Aldrich
Acido elágico	2,6,2',6'-dilactona del ácido 4,4',5,5',6,6'- hexahidroxidifénico	Apin
Acido eudésmico	Acido 3,4,5-trimetoxibenzoico	*
Acido fenilpirúvico	Acido 3-fenil-2-oxo-propanoico	Aldrich
Acido ferúlico	Acido 3-(4-hidroxi, 3-metoxi), 2-propenoico. (Acido 4-hidroxi, 3-metoxicinámico)	

Acido gálico	Acido 3,4,5-trihidroxibenzoico	Fluka
Acido gentísico	Acido 2,5-dihidroxibenzoico	
Acido <i>p</i> -cumárico	Acido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico. (Acido 4-hidroxicinámico).	
Acido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Acido 4-hidroxibenzoico	
Acido prefénico	Acido 1-carboxi-4-hidroxi-2,5-ciclohexadien-1-(2-oxo-propanoico).	
Acido protocatéquico	Acido 3,4-dihidroxibenzoico	Aldrich
Acido rosólico	4-(bis-(4-hidroxifenil)-metilen-2,5-ciclohexadieno	Fluka
Acido salicílico	Acido 2-hidroxibenzoico	May & Baker
Acido sinápico	Acido 3-(4-hidroxi, 3,5-dimetoxifenil), 2-propenoico. (Acido 4-hidroxi, 3,5-dimetoxicinámico).	
Acido siquímico	Acido 3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexen-1-carboxílico	
Acido siríngico	Acido 4-hidroxi, 3,5-dimetoxibenzoico	Chem Service
Acido 2,4,6-trihidroxibenzoico	Acido 2,4,6-trihidroxibenzoico	Aldrich
Acido vainílico	Ac. 4-hidroxi-3-metoxibenzoico	Aldrich
Acido verátrico	Acido 3,4-dimetoxibenzoico	
Afzelequina	3,5,7,4'-tetrahidroxiflavano	
Alcohol coniferílico	3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propen-1-ol.	
Alcohol gentísico	2,5-dihidroxi-bencilalcohol	
Alcohol salicílico	2-hidroxibencilalcohol	
Alcohol siríngico	4-hidroxi-3,5-dimetoxibencil alcohol	
Ald. <i>p</i> -hidroxibenzóico	4-hidroxibenzaldehído	
Aldehído protocatéquico	3,4-dihidroxibenzaldehído	*

Aldehído siringico	4-hidroxi-3,5-dihidroxibenzaldehído	Aldrich
Alpinetina	7-hidroxi-5-metoxiflavanona	
Amentoflavona	3',8'-biapigenina	
Apigenina	5,7,4'-trihidroxiflavona	Sigma
Arbutina	4-hidroxifenil- $\beta$ -D-glucopiranósido	
Aromadendrina	3,5,7,4'-tetrahidroxiflavanona	
Aureisidina	4,6,3',4'-tetrahidroxi-2-bencilidencumaranona (4,6,3',4'-tetrahidroxiaurona)	
Biochanina A	5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona	
Buteína	2',3,4,4'-tetrahidroxichalcona	
Catequina	3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavano (trans)	Sigma
Cianidina	3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavilio	Apin
Cianidín-3-galactósido	5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-galactosil-flavilio	Apin
Cianidín-3-rutinósido	5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-rutinosil-flavilio	Apin
Cianina	7,3',4'-trihidroxi-3,5-diglucosil-flavilio	Apin
<i>cis</i> -leucocianidina	<i>cis</i> -3,4,5,7,3',4'-hexahidroxiflavano	
<i>cis</i> -leucodelphinidina	<i>cis</i> -3,4,5,7,3',4',5'-heptahidroxiflavano	
Crisina	5,7-dihidroxiflavona	Sigma
Crisoeriol	5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona	
Daidzeína	7,4'-dihidroxiisoflavona	
Delfinidina	3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavilio	Roth
8-desmetileucaliptina	5-hidroxi-6-metil-7,4'	

8-desmetilsideroxilina	5,4'-dihidroxi-6-metil-7-metoxiflavona	
2,6-dibromoquinona clorimina	2,6-dibromoquinona clorimina	Roth
Didimina	5,4'-dihidroxi-7-rutinosil-flavanona (isosakuranetín-7-O-rutinósido)	
2,6-dimetoxifenol	2,6-dimetoxifenol	Aldrich
Diosmetina	5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavona	
Epicatequina	3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavano (cis)	Sigma
Epigallocatequina	3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavano (cis)	
Eriocitrina	5,3',4'-trihidroxi-7-rutinosil-flavanona (eriodictyol-7-O-rutinósido)	
Eriodictyol	5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona	Roth
Eucaliptina	5-hidroxi-6,8-dimetil-7,4'-dimetoxiflavona	
Fisetina	3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona	Aldrich
Flavona	2-fenil-cromona	Sigma
Flavanona	2-fenil-dihidrocromona	Aldrich
Floretina	2',4,4',6'-tetrahidroxidihidrochalcona	
Floridzina	4,4',6'-trihidroxi-2'-glucosil-dihidrochalcona (floretín-2-O-glucósido)	
Formononetina	7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona	
Galangina	3,5,7-trihidroxiflavona	
Galocatequina	3,5,7,3',5',7'-hexahidroxiflavano (trans)	
Genistefna	5,7,4'-trihidroxiisoflavona	
Genkwanina	5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona	
Hesperetina	5,7,3'-trihidroxi-4'	Sigma

Hesperidina	5,3'-dihidroxi-4'-metoxi-7-rutinosil-flavanona (hesperetín-7-O-rutinósido)	Sigma
Hinokiflavona	4',6'-biapigenina	
Hiperósido	5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-galactosil-flavona (quercetín-3-O-galactósido)	Apin
Hispidulina	5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavona	
Isoquercitrina	5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-glucosil-flavona (quercetín-3-O-glucósido)	Apin
Isoramnetina	3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxi-flavona	
Isosakuranetina	5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona	Apin
Kaempferol	3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona	Sigma
Kaempferol-7-neohesperidósido	3,7,4'-trihidroxi-5-neohesperidosil-flavona	Roth
Kuromanina	5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-glucosil-flavilio (cianidín-3-O-glucósido)	Apin
Leptosidina	6,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-aurona	
Leucopelargonidina	3,4,5,7,4'-pentahidroxiflavano	
Luteolina	5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona	Roth
Luteolín-7-glucósido	5,3',4'-trihidroxi-7-glucosil-flavona	Roth
Maisina	5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-(2''-ramnosil-6-desoxixilohexos-4-ulosil)-flavona	
Malvidina	3,5,7,4'-tetrahidroxi-3',5'-dimetoxi-flavilio	
7-metilaromadendrina	3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavanona	
Miricetina	3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavona	Sigma

Morina	3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona	
Naringenina	5,7,4'-trihidroxiflavanona	Sigma
Naringina	5,4'-dihidroxi-7-neohesperidosil-flavanona (naringenín-7-O-neohesperidósido)	Sigma
Narirutina	5,4'-dihidroxi-7-rutinosil-flavanona (naringenín-7-O-rutinósido)	
Naturstoffreagenz A	Ester 2-aminoetílico del ácido difenilbórico	Aldrich
Nepitrina	5,3',4'-trihidroxi-6-metoxi-7-glucosilflavona	
Nobiletina	5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona	
Okanina	2',3,3',4,4'-pentahidroxichalcona	
Orientina	5,7,3',4'-tetrahidroxi-8-C-glucosilflavona (luteolín-8-C-glucósido)	
Patuletina	3,5,7,3',4'-pentahidroxi-6-metoxiflavona	
Pelargonidina	3,5,7,4'-tetrahidroxiflavilio	Sigma
Pinocembrina	5,7-dihidroxiflavanona	Apin
8-C-prenilisoramnetina	3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxi-8-C-(3,3'-dimetilalil)-flavanona	
Prunetina	5,4'-dihidroxi-7-metoxiisoflavona	Apin
Quercetagetina	3,5,6,7,3',4'-hexahidroxiflavona	
Quercetina	3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona	Sigma
Quercitrina	5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-ramnosil-flavona (quercetín-3-ramnósido)	Roth



Ramnetina	3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxiflavona	
Rutina	5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-rutinosil-flavona (quercetín-3-rutinósido)	Sigma
Sakuranetina	5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavanona	Apin
Schaftosido	5,7,4'-trihidroxi-6-C-glucosil-8-C-arabinosil-flavona	
Sideroxilina	5,4'-dihidroxi-6,8-dimetil-7-metoxiflavona	
Sulfuretina	6,3',4'-trihidroxiaurona	
Tangeretina	5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona	
Taxifolina	5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona	Sigma
Tectocrisina	5-hidroxi-7-metoxiflavona	Apin
Umbeliferona	7-hidroxycumarina	
Vainillina	4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído	Merck
Vicenín-2	5,7,4'-trihidroxi-6,8-C-diglucosil-flavona	
Violantina	5,7,4'-trihidroxi-6-C-glucosil-8-C-ramnosil-flavona	
Vitexina	5,7,4'-trihidroxi-8-C-glucosil-flavona	Roth

\* = cedido por la Dra. Carmen Gómez-Cordovés

**APENDICE II. AREAS DE LOS PICOS CROMATOGRAFICOS EN LOS EXTRACTOS DE MADERA, CORTEZA Y HOJAS DE *E. CAMALDULENSIS*, *E. GLOBULUS* Y *E. RUDIS*.**

Las tablas siguientes contienen los valores de las áreas de los picos cromatográficos de cada componente en los extractos de madera, corteza y hojas de las tres especies de *Eucalyptus* analizadas. Estos valores se han corregido teniendo en cuenta los factores de dilución aplicados en cada muestra. De esta manera, se pueden comparar las áreas de los picos de los extractos de todas las muestras de madera, independientemente de la especie a que pertenezcan. Lo mismo ocurre con las cortezas y con las hojas. Sin embargo, no es posible comparar entre sí las áreas de los componentes de distintas partes del árbol, debido a las pequeñas diferencias en el proceso de extracción de cada una de ellas.

Áreas de los picos cromatográficos en los extractos de madera de <i>E. camaldulensis</i>								
Nº	Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	Ac. gálico	148	288	154	165	207	148	175
2	*	2184	396	741	749	2116	21	40
3	*	2378	546	1011	991	2520	83	145
4	Ac.vainíll.	0	0	0	0	0	67	120
5	Vainillina	187	652	971	345	544	437	860
6	Ald.siring.	504	1420	2716	605	646	837	1118
7	Der.siring.	328	1885	2916	892	418	1759	1684
8	Flavanona	0	0	0	0	0	1260	417
9	*	717	0	0	171	0	0	0
10	*	1536	0	791	321	2230	0	0
11	Ac. elágico	870	5292	2678	1238	1048	2698	2727
12	Flavanona	0	0	0	0	0	1028	844
13	*	0	0	0	0	0	1091	1710
14	Elagitanino	719	370	912	0	573	801	1084
15	Elagitanino	371	1109	0	223	758	0	0
16	Naringenina	0	0	934	221	0	0	0
17	Elagitanino	912	578	723	132	354	306	735
18	Flavanona	0	0	382	0	0	0	0
19	Elagitanino	607	761	581	130	427	552	1175
20	Flavanona	0	0	0	0	0	278	332

\* = no identificado.

Áreas de los picos cromatográficos en los extractos de corteza de  
*E. camaldulensis*

Nº	Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	Ac. gálico	608	973	1041	216	774	144	80
2	Ac. protocatéqui.	3297	2766	0	2573	0	53	119
3	*	1687	819	3525	0	3209	0	0
3a	Ald. protocateq.	1306	1402	777	1810	535	0	0
4	Ac. vainíllico	0	0	0	0	0	159	0
5	Ac. siríngico	0	0	0	0	0	115	0
6	Vainillina	361	0	0	0	0	194	0
7	Flavanona	758	937	1302	0	1509	0	0
8	Naringina	0	432	0	0	0	0	0
9	Ac. elágico	5402	6161	11327	4956	10196	2812	2936
10	Quercitrina	0	0	1452	0	833	0	0
11	Eriodictyol	680	878	0	0	833	626	0
12	Elagitanino	628	430	638	0	1566	0	0
13	Elagitanino	1826	1435	1312	915	1713	962	485
14	Quercetina	979	1100	656	940	927	0	0
15	Naringenina	721	565	348	0	1405	0	0
16	Flavanona	1265	417	2086	0	598	0	0
17	Luteolina	533	426	662	0	862	0	0
18	Flavonol	1291	2282	886	0	863	0	0
19	Kaempferol	0	0	0	0	442	0	0
20	Flavanona	874	1045	379	0	0	0	0
21	Elagitanino	0	0	0	336	1442	0	0
22	*	0	0	0	0	0	672	0
23	Est. ac. benzóico	0	0	0	0	0	0	188
24	*	0	0	0	0	0	541	0
25	*	0	0	0	0	0	0	1806
26	*	0	0	0	0	0	0	1282

\* = no identificado

Áreas de los picos cromatográficos en los extractos de hojas de  
*E. camaldulensis*

Nº	Componente	HEC1	HEC2	HEC3	HEC4	HEC5	PEC1	PEC2
1	Ac. gálico	2527	1355	2276	1824	1890	3114	1353
2	Ac. protocatéquico	720	623	957	623	697	1117	712
3	Vainillina	0	0	0	0	0	940	794
4	Elagitanino	1834	1769	1754	1587	3862	0	0
5	Flavonol	0	0	0	0	0	2831	2578
6	Flavonol	0	0	0	0	0	6153	4770
7	Rutina	4005	0	0	5634	3764	3448	2442
8	Ac. elágico	13571	8719	9890	8688	9072	10989	8213
9	Quercetín-3-arabi.	12460	7780	12628	9890	0	16879	13138
10	Quercet-3,7-diram.	0	3706	2826	0	0	16477	13040
11	Quercitrina	0	7531	2661	3847	6140	1466	1284
12	Kaempferol-3-arab.	0	0	0	5381	0	15733	12348
13	*	5907	2221	3938	2874	5241	3895	3038
14	Luteolina	0	3543	0	0	0	0	0
15	*	4035	0	0	3041	2754	0	0
16	Flavonol	0	4568	4340	0	0	2105	1089
17	Kaempferol	0	1720	0	0	0	0	0
18	*	1351	4072	2987	1216	1161	0	0
19	*	1991	2126	1242	2070	0	0	0
20	Flavonol	0	4125	2479	0	0	1253	1065
21	*	3916	4305	2617	4400	2467	0	0
22	*	3410	3985	3182	4094	2638	0	0
23	*	4885	4923	3637	5180	4328	0	0
24	Sesquiterpeno (?)	10031	5167	8477	7173	11947	593	262
25	Sesquiterpeno (?)	11455	5226	8569	10918	14254	4834	3319
26	Sesquiterpeno (?)	572	194	337	424	435	1425	1476

\* = no identificado

Áreas de los picos cromatográficos en los extractos de madera de  
*E. globulus*

Nº	Componente	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	Ac. gálico	404	393	584	535	701	1233	370	309	413	318
2	*	303	0	293	403	264	0	0	0	0	0
3	*	405	203	415	636	423	1135	953	524	135	422
4	Ac.vainill.	0	0	0	0	0	0	0	314	185	247
5	Vainillina	537	485	520	716	813	1527	1338	975	783	1237
6	Ald.siring.	1842	677	1169	2247	1049	5229	7039	2530	2260	4219
6a	*	689	0	355	503	0	0	1644	0	0	299
7	Der.siring.	2488	1157	1810	3108	1610	8597	6683	4334	3208	5691
11	Ac.elágico	3837	3959	3748	4838	4859	8715	4733	4835	4570	6429
13a	Elagitanino	1359	1032	2091	1259	1795	2604	2214	1618	1234	1598
13b	Flavonol	151	114	0	0	367	296	521	809	771	799
14	Elagitanino	376	373	690	0	909	0	0	0	0	0
15	Elagitanino	991	623	1200	1759	1812	2451	2475	1746	1191	1543
16	Naringenina	0	0	424	0	0	0	0	0	0	0
16a	Quercetina	0	314	783	0	0	0	0	0	0	0
16b	Elagitanino	0	764	845	0	0	0	932	0	0	0
17a	Flavonol	0	0	1506	0	0	0	0	0	0	0
17	Elagitanino	463	415	648	508	579	0	0	948	683	335
19	Elagitanino	556	415	619	861	786	0	949	648	1243	783

\* = no identificado

Areas de los picos cromatográficos en los extractos de corteza de  
*E. globulus*

Nº	Comp.	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	A.gál	825	1222	1467	1000	607	819	277	306	150	259
2	A.pro	607	805	853	408	181	0	0	0	0	0
3	*	0	461	0	307	111	0	0	0	0	0
3a	Ad.pr	511	337	333	238	143	0	0	0	0	0
4	A.vai	0	302	244	0	0	0	0	0	0	0
7a	Taxif	0	799	452	835	0	387	400	651	326	532
9	A.elá	10393	12856	7165	8772	7023	12115	7211	9673	10005	3975
11	Eriod	618	1553	1348	3120	455	0	2050	3077	938	1799
12	Elagi	0	1701	0	1351	1095	0	0	0	0	0
13	Elagi	14227	11640	18982	15846	15450	1270	13209	16537	18168	12452
14	Querc	0	2186	1370	922	767	0	1950	2860	0	1084
14a	Elagi	1262	3743	2745	922	652	0	1255	0	0	0
15	Narin	0	549	0	325	271	0	202	0	0	219
18	Flavo	0	4362	6553	4555	3941	0	2803	5115	1941	0
18a	Elagi	2805	1981	1388	428	0	0	1206	445	814	6361
20a	Apige	0	0	0	0	0	0	375	0	0	573
21a	Elagi	0	2106	1790	0	0	0	900	0	0	0
21	Elagi	1058	0	959	1866	1617	0	0	2236	1378	1351

\* = no identificado

Areas de los picos cromatográficos en los extractos de hojas de  
*E. globulus*

Nº	Comp.	HEG1	HEG2	HEG3	HEG4	HEG5	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5
1	A.gál	1397	1769	1863	2237	1784	925	1427	1340	0	0
3	Vaini	0	0	0	0	0	1069	0	0	0	0
7a	*	5651	0	3500	2602	2589	696	3662	1666	4681	1242
8	A.elá	14384	13511	15326	12708	14376	10713	12339	12470	15609	14926
11	Querc	3273	9394	9796	11146	6138	4470	6287	5648	7265	4580
11a	Elagi	2020	1225	2538	2149	1845	0	1925	1152	0	1504
13a	Elagi	8212	9921	5227	5940	13183	2889	6317	4914	5749	8827
13b	*	4071	5029	5526	4460	4115	1580	2182	3473	1810	5133
13c	*	3526	1975	3796	4226	2480	2320	968	1263	2048	3065
13	*	1594	1697	3136	2620	1323	1009	1635	1413	998	1030
14	Luteo	2345	3039	3258	3439	3425	0	0	2677	0	0
15	*	6255	7655	5819	8903	0	6130	3996	3471	4763	4684
15a	Elagi	0	0	0	0	4991	0	5256	0	0	0
17a	D.api	0	0	6299	0	0	0	0	0	0	0
18	*	881	2481	0	2490	1848	1833	1976	2075	2660	2113
19	*	1550	2732	3281	2156	1902	1174	1202	1662	2441	2015
19a	Apige	2105	1504	2927	0	0	0	1375	1016	0	0
20b	Elagi	1627	0	0	0	2424	0	1123	0	1421	0
21	*	2541	1564	3067	2844	2127	1648	1350	968	1250	2490
22	*	1214	1160	1291	805	1427	618	0	0	0	0
22a	Flava	0	0	0	0	0	3442	3312	2559	0	0
22b	D.kae	1480	871	2378	1496	1265	0	0	0	0	0
24	Sesqu	1761	0	2366	4929	2389	0	1932	1402	1809	2812
25	Sesqu	3788	3886	5632	13297	5623	3972	3565	4209	4977	3838
25a	Sesqu	0	2222	3381	0	5166	0	0	0	2734	0
26	Sesqu	0	2538	2553	2662	4402	1411	1457	1112	3081	0

\* = no identificado

Areas de los picos cromatográficos en los extractos de madera de  
*E. rudis*

Nº	Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	Ac. gálico	242	310	102	258	52	181	284	556	488
2	*	0	107	157	51	17	0	0	0	0
3	*	108	225	377	172	84	277	187	949	309
4	Ac.vainíllico	197	183	160	137	102	123	158	363	529
5	Vainillina	827	764	687	509	280	324	598	1241	643
6	Ald. siríngico	2963	1970	1506	923	566	443	1137	2340	936
6a	*	605	369	211	116	104	0	0	0	0
7	Der. siríngico	3200	2555	1767	1528	895	775	1350	3355	1320
11	Ac. elágico	2768	2296	2491	2327	1565	1812	6748	4165	15347
13a	Elagitanino	524	611	587	516	273	123	287	921	0
13b	Flavonol	524	609	592	516	271	126	288	923	1249
15	Elagitanino	756	0	431	0	0	0	933	0	2564
15a	*	0	514	0	214	227	362	0	1297	0
17	Elagitanino	0	0	419	302	230	305	917	0	2585
19	Elagitanino	582	321	568	325	288	234	542	511	1511
20	Flavanona	0	629	853	597	182	0	0	763	1055

\* = no identificado

Areas de los picos cromatográficos en los extractos de corteza de  
*E. rudis*

Nº	Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	Ac. gálico	494	181	0	187	0	0	0	0	0
2	Ac. protocatéq.	917	1527	198	1921	531	0	0	0	0
3a	Ald. protocat.	864	1371	366	1782	1286	0	0	0	0
4	Ac. vainíllico	565	438	190	561	400	0	0	0	0
6	Vainillina	372	0	140	308	188	0	0	0	0
9	Ac. elágico	6123	3153	1826	7197	1260	0	0	0	0
13	Elagitanino	867	1235	226	1441	471	0	0	0	0
18a	Elagitanino	636	410	284	938	692	0	0	0	0
21a	Elagitanino	0	811	353	0	537	0	0	0	0
21	Elagitanino	679	742	691	716	1738	0	0	0	0
22a	*	840	888	0	0	458	0	0	0	0
22b	Est.ac.benzóico	0	694	0	0	0	721	1138	0	1805
22c	*	0	621	0	0	0	0	0	0	0
22	*	0	0	0	0	0	585	654	0	1037
23	Est.ac.benzóico	0	0	0	0	0	3177	4528	0	6483
24a	Est.ac.cinámico	0	0	0	0	0	0	0	3419	0
26a	Est.ac.cinámico	0	0	0	0	0	0	0	7702	0

\* = no identificado



Áreas de los picos cromatográficos en los extractos de hojas de  
*E. rudis*

Nº	Componente	HER1	HER2	HER3	HER4	HER5	PER1	PER2	PER3	PER4
1	Ac.gálico	699	314	259	1706	708	1101	746	1509	1503
2	Ac.protoca.	0	0	0	370	0	362	105	267	574
3	Vainillina	736	734	527	1189	962	722	689	1120	1491
7	Rutina	0	1145	859	4851	2094	2530	1063	2152	2497
8	Ac.elágico	15699	9024	8329	11910	15568	15953	16801	11423	12260
9	Quer-3-arab	8487	3384	0	12832	8526	7466	7753	9683	9412
10	Q-3,7-diram	2774	798	1401	0	0	2965	3085	4173	4767
11	Quercitrina	3086	0	0	5094	0	3121	2727	2931	3582
12	Kaem-3-arab	9705	2124	0	21242	14631	9166	4262	6898	5338
13a	Elagitanino	2098	1139	1956	2125	2819	1161	1647	0	0
13b	*	0	1399	4989	0	3317	1985	1549	2598	2781
13c	*	0	0	0	3144	0	2757	6290	3557	5198
13d	Quercetina	5841	2735	4221	4655	4512	0	0	0	0
13	*	0	0	0	0	0	2190	0	3571	2511
14a	Naringenina	3581	1934	1475	0	0	0	2322	0	0
14b	Flavanona	4347	2527	2752	0	0	0	0	0	0
16	Flavonol	4191	2641	2688	9774	4537	5100	6655	8670	5756
16a	Flavanona	0	1186	0	0	0	0	1047	0	0
17b	Flavonol	0	0	3725	3201	4178	1703	0	2790	0
18	*	1051	892	0	2984	0	3846	0	4652	3241
19	*	2519	2415	0	2420	1826	0	0	2012	2208
20a	*	3815	2308	2616	1362	2259	0	0	0	0
20b	Elagitanino	2489	1564	2866	2112	2906	0	0	0	0
21	*	1723	1521	1309	0	2087	5595	6982	9216	7873
22	*	0	1485	1413	0	0	5061	1508	5683	5216
22a	Flavanona	0	1524	0	0	0	0	2620	0	0
22b	Der.kaempf.	1852	1573	7055	0	3548	0	2112	0	0
23	*	1002	1110	1894	1553	2339	2396	866	2365	1973
24	Sesquiter.?	4741	2745	7108	7224	9283	1302	0	2155	1195
25	Sesquiter.?	8345	8574	13258	11613	15564	1436	1079	2021	2020
25a	Sesquiter.?	4361	2891	0	1026	0	435	4516	0	0
26	Sesquiter.?	2532	2295	0	0	0	2192	0	0	0

\* = no identificado